

ISOLIERUNG UND REINDARSTELLUNG
VON INTER-ALPHA-TRYPSININHIBITOR
AUS HUMANSERUM
CHARAKTERISIERUNG DER GLEICHZEITIG
ANFALLENDEN "DERIVATE"

Dorothea Fischbacher

1979
9

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551922_0043

Aus dem Biochemischen Laboratorium (Leitung: Prof. Dr. K. Hochstraßen)
der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

ISOLIERUNG UND REINDARSTELLUNG
VON INTER-ALPHA-TRYPSININHIBITOR
AUS HUMANSERUM

CHARAKTERISIERUNG DER GLEICHZEITIG ANFALLENDEN "DERIVATE"

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dorothea Fischbacher
aus
Rosenheim

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Hochstraßer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. H. Naumann
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1979



Meinen Eltern
mit herzlichem Dank
gewidmet

INHALTSANGABE

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. THEORETISCHER TEIL	3
A) Die Proteine und ihre Inhibitoren	3
B) Hemmechanismen	4
C) Die Proteinaseinhibitoren des Serums	6
D) Der Inter-Alpha-Trypsininhibitor	10
1. Stabilität und andere Eigenschaften	10
2. Physikalische und chemische Eigenschaften	11
3. Spezifität und Kinetik	12
4. Verteilung des intakten Moleküls	13
5. Phylogenese	13
6. Beziehung zu anderen Inhibitoren	14
6.1. Säurestabile Derivate im Serum und Urin - Strukturelle Ergebnisse	14
6.2. ITI und I-30 bei pathologischen Zuständen	17
6.3. Säurestabile Derivate im Respirationstrakt	18
6.4. Säurelabile Derivate	19
7. Verfahren zur Isolation des ITI	20
7.1. Methode nach Heimbürger	21
7.2. Methode nach Steinbuch	21
III. ERGEBNISSE DER EINZELNEN VERSUCHSABSCHNITTE	23
IV. EXPERIMENTELLER TEIL	41
A) Ionenaustausch-Chromatographie zur Isolierung von ITI-Rohmaterial aus Humanserum (DEAE-Zellulose SH 23)	41

	Seite
1. Allgemeines zur Ionenaustausch-Chromatographie	41
1.1. Methodik der IA-Chromatographie	41
1.2. Proteine bei der IA-Chromatographie	43
1.3. Zellulose-Ionenaustauscher	44
2. Vorbereitung zur Chromatographie	44
2.1. Vorbehandeln des Ionenaustauschers	44
2.2. Packen der Säule	45
2.3. Äquilibrieren	46
3. Durchführung der Chromatographie	46
3.1. Ausgangsmaterial zur Gewinnung von ITI	46
3.2. Aufbringen der Probe	46
3.3. Elution	47
4. Testung des Eluates auf ITI-Gehalt mittels:	48
4.1. Elektroimmundiffusion nach Laurell	48
4.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
 B) Ammoniumsulfatfällung als Anreicherungs- und wei- teren Reinigungsschrittes des ITI-Rohmaterials	 51
1. Allgemeines	51
1.1. Löslichkeitseigenschaften von Proteinen	51
1.2. Aussalzung von Proteinen	51
2. Aufbereitung des Eluates	52
 C) Gelfiltration auf Biogel A-5m zur Reindarstellung von homogenem ITI und "ITI-Derivaten"	 53
1. Allgemeines zur Gelfiltration	53
2. Vorbereitung zur Gelfiltration	53
2.1. Wahl des Puffers zur Gelfiltration	53
2.2. Anhang: Inhibitor:enincubate	54
3. Durchführung der Gelfiltration	56

	Seite
D) Charakterisierung des ITI und seiner "Derivate" mittels:	56
1. Zweidimensionaler Immunelektrophorese	57
2. Fibrinagarelektrophorese	57
3. Trypsinhemmtestes	58
4. I-14-Freisetzung durch Trypsinüberschuß	60
5. Perchlorsäurefällung der Nativpräparate	60
6. Eindimensionaler Immunelektrophorese	61
 V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	 62
 VI. ZUSAMMENFASSUNG	 66
 VII. LITERATURVERZEICHNIS	 67

I. EINLEITUNG

Erste Beobachtungen über antitryptische Aktivitäten im Serum machten Fermi und Pernossi 1894 (15), Camus und Gley (8), Pugliese und Coggi (69) setzten dies mit ihren Veröffentlichungen über die Proteinaseinhibitoren des Serums im Jahre 1897 fort. Um 1900 gelang es Landsteiner, die antitryptische Aktivität in die Albuminfraktion einzuordnen (56).

1955 schließlich berichtete Jakobsson, nachdem Shulman (78) zwei Serum-inhibitoren beschrieben hatte, daß 90 % der antitryptischen Aktivität in der α_1 -Globulinzone und 10 % in der α_2 -Globulinzone zu finden seien (48).

Trennversuche der Inhibitoren führten zur heutigen Kenntnis von mindestens sechs Proteinaseinhibitoren im menschlichen Plasma. 1955 glückte es Schultze und anderen, den von Jakobsson bestimmten Hauptbestandteil als ein α_1 -3,5 S-Glykoprotein zu identifizieren (75), das später nach Erkenntnis seiner Wirkung als Haupttrypsin-inhibitor α_1 -Antitrypsin bezeichnet wurde (76). Zehn Jahre später wiesen Heimbürger und Schwick, Heimbürger und Haupt mit Hilfe der Stärkegel-Elektrophorese auf fibrinhaltigen Platten fünf weitere Proteinaseinhibitoren nach: Das α_2 -Makroglobulin, das α_1 -Anti-chymotrypsin, den C_1 -Inaktivator, den Inter- α -Trypsininhibitor und das Antithrombin III, benannt entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit und damals bekannten physiologischen Bedeutung (32/33).

Der in dieser Arbeit interessierende Inter- α -Trypsininhibitor (= ITI) wurde 1961 zum ersten Mal von Steinbuch als π -Protein beschrieben, bevor er - wie oben erwähnt - 1966 als Inhibitor charakterisiert wurde. Viele Jahre lang behandelte man ihn als ein physiologisch unbedeutendes Spurenprotein im Plasma, bis seine Beziehung zu anderen Inhibitoren entdeckt wurde (31/80).

So berichteten Orochs und Nordschow (65), daß der zuerst von Astrup (2) beschriebene Urintrypsininhibitor "Mingin" immunologisch zum ITI in Beziehung steht.

Hochstraßer und Mitarbeiter fanden im oberen Respirationstrakt zwei säurestabile niedermolekulare Inhibitoren mit Molekulargewicht (= MG) von 20.000 und 14.000, die dort 80 % der anti-tryptischen Aktivität bestreiten und darüberhinaus eine vom ITI nicht unterscheidbare antigene Determinante tragen (38/39).

Dieselbe Gruppe beschrieb die Existenz zweier weiterer säurestabiler Inhibitoren im Enteiweißungsüberstand des Plasmas (MG 44.000 und 22.000). Beide zeigen immunologische Verwandtschaft sowohl zum ITI wie zum im Urin gefundenen Inhibitor (40).

1976 gelang der Nachweis, daß der ITI offensichtlich als physiologischer Vorläufer des identischen säurestabilen Proteinaseinhibitors im menschlichen Serum und Urin zu gelten hat, wobei in vivo wahrscheinlich der Elastase aus PMN-Leukozyten die Rolle des "liberating enzyme" zugeteilt werden muß (Hochstraßer, unveröffentlicht).

Neueste Versuche mit zweidimensionalen Immunelektrophoresen berichten von wenigstens zwei säurelabilen Derivaten des ITI, die bei pathologischen Zuständen einen teilweise nicht unerheblichen Anstieg zeigen und so mögliche Diagnosewege zu eröffnen scheinen (46).

Diese Arbeit hat zur Aufgabe, den ITI, der als sehr instabil bekannt ist, zum Zwecke weiterer experimenteller Untersuchungsverfahren in größeren Mengen und ausreichendem Reinheitsgrad zu gewinnen. Zudem soll das bei seiner Isolierung anfallende, bereits von Steinbuch beobachtete, heterogene Material mit nicht unterscheidbaren Antigen-Eigenschaften näher charakterisiert werden (83).

II. THEORETISCHER TEIL

A) Die Proteine und ihre Inhibitoren

Der Name "Protein" wurde von Berzelius geprägt und ist abgeleitet vom Griechischen "proteuo" – ich nehme den ersten Platz ein.

Die Proteine tragen ihren Namen zu Recht, denn wir kennen kein Leben ohne sie. Jedes übt mindestens eine spezifische Funktion aus. Manche erlangen ihre biologische Aktivität nur nach Interaktion mit einem oder mehreren Plasmafaktoren. Die Endprodukte solcher Aktivationsketten sind die Enzyme, die sogenannten Katalysatoren der lebenden Zelle.

Die meisten Proteine des Organismus werden laufend auf- und wieder abgebaut. Der Eiweißabbau geschieht durch proteolytische Enzyme. Diese werden unter die CN-Hydrolasen eingereiht, da ihre Wirkung durch Spaltung der Peptidkette erfolgt. Entsprechend ihrer Funktion teilt man sie in Exo- und Endopeptidasen ein. Letztere wirken vorwiegend auf Proteine und stellen die eigentlichen Proteinasen oder Proteasen dar. Hierher gehören die bekannten Verdauungsfermente Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin (49).

Zur Bindung und Neutralisation der Proteinasen verfügt der Organismus über einen besonderen Steuerungsmechanismus – die Proteinaseinhibitoren.

Natürliche Inhibitoren kommen in Pflanzen und Tieren, in Drüsensekreten und im Blut vor. Sie sind entweder hochmolekulare Proteine oder niedermolekulare säure- und thermostabile Polypeptide. Ihr Hemmspektrum ist sehr verschieden. Es gibt streng spezifische Inhibitoren, die nur ein Enzym zu hemmen vermögen und polyvalente,

die auf mehrere Enzyme wirken. Der Inhibitor blockiert hierbei jeweils alle katalytischen Funktionen des betreffenden Enzyms.

Man unterscheidet auch zwischen Lysin- und Arginininhibitoren nach der Aminosäure, die im aktiven Zentrum für die Hemmwirkung gegenüber Trypsin verantwortlich ist. Durch Acylierung der ϵ -Aminogruppen werden die Lysininhibitoren inaktiviert, während die Arginininhibitoren ihre volle Aktivität behalten.

Viele bisher untersuchte Hemmstoffe zeigen Analogität zu den zwei klassischen Trypsininhibitoren: Den von Kunitz und Northrop 1936 isolierten Pankreastrypsininhibitor aus Rinderorganen (54), der unter der Bezeichnung Trasylol^R therapeutisch verwendet wird, oder den von Kazal 1948 gefundenen Sojabohnentrypsininhibitor (50).

Diese beiden Hemmstoffe sind laut Untersuchungen selbst Ergebnis einer konvergenten Evolution, da sie wohl Analogität, aber nicht Homologität zeigen. Sie sind somit Repräsentanten zweier verschiedener Familien von Proteinaseinhibitoren, die als Kunitz- bzw. Kazalinhibitoren bezeichnet werden.

Zur Erkennung der Proteinaseinhibitoren bei Reinigungsverfahren bedient man sich immunologischer Methoden. Immunisiert man Kaninchen mit gereinigten Inhibitoren, so erhält man monospezifische Antisera. Letztere eignen sich, die Hemmstoffe zu quantifizieren und zu charakterisieren.

B) Hemmechanismen

Nach allgemeiner Übereinstimmung bilden die Inhibitoren stark assoziierte, meist reversible Komplexe mit den Enzymen, die sie

hemmen. Solange der Komplex besteht, ist die enzymatische Aktivität des Enzyms gegenüber seinem Substrat, das normalerweise auch anwesend ist, durch Besetzung der aktiven Stelle geblockt.

Gorini und Audran beschrieben 1952/53 erstmals die enzymatische Hydrolyse eines Inhibitors durch ein proteolytisches Enzym (27/28). Der Verlust der Hemmwirkung des Inhibitors infolge Hydrolyse im Komplex wurde "temporäre" Hemmung genannt (57).

Die Gruppe um F. E. Nord (1954) vermutete eine Enzym-Substrat-ähnliche Beziehung als wesentliche Ursache der Hemmung. Bei einer Vielfalt von Inhibitoren ist die Enzym-Inhibitor-Reaktion tatsächlich in der ersten Phase einer Enzym-Substrat-Reaktion vergleichbar. Es erfolgt die Spaltung einer besonders sensitiven Peptidkette im aktiven Zentrum des Inhibitors durch das proteolytische Enzym. Die Folge dieser Spaltung ist jedoch nicht Hydrolyse des gesamten Moleküls und Freisetzung der Proteinase wie beim Enzym-Substrat-Komplex, sondern die Ausbildung einer kovalenten Bindung, das heißt die Aufrechterhaltung der Hemmwirkung.

Man spricht hierbei von einer limitierten Proteolyse des Inhibitors (18/19).

Demgegenüber finden sich auch Fälle, bei denen die Primärstruktur des Inhibitors erhalten bleibt. Hier bewirken nur Bindungskräfte zwischen den Molekülen die Hemmung (51).

Speziell bei der Interaktion von Trypsin und Plasmin mit ihren Inhibitoren sind entsprechend ihrer Spezifität die Lysin- und Argininreste in den Hemmvorgang miteinbezogen. Viele Beobachtungen berichten so über die unbedingte Notwendigkeit der ϵ -Aminogruppen der Lysinseitenkette zur Trypsinhemmung.

C) Die Proteinaseinhibitoren des Serums

Die Proteinaseinhibitoren des Plasmas - α_1 -Antitrypsin ($=\alpha_1A$), α_2 -Makroglobulin ($=\alpha_2M$), C_1 -Inaktivator ($=C_1INA$), Antithrombin III ($=AT\ III$), α_1 -Antichymotrypsin ($=\alpha_1X$), ITI - sind weit verteilt. Sie werden in Körperflüssigkeiten, in Geweben und Organen, besonders in den sekretorischen, beobachtet. Alle sind Glykoproteine (34), wobei der Kohlenhydratgehalt für den aktiven Transport durch die Zellmembran von Bedeutung sein dürfte. Mit Ausnahme von α_1X haben sie polyvalente Affinitäten und die Beteiligung von mehr als einer Antiproteinase in biologischen und pathologischen Geschehnissen ist sehr häufig. Im Blut kontrollieren sie proteolytisch regulierte Prozesse, wie Blutgerinnung, Fibrinolyse, Kininfreisetzung und Komplementbindung (Abb. 1). Daher haben Veränderungen ihrer Plasmaspiegel diagnostische Bedeutung erlangt.

α_1A , das im Serum den Hauptteil der α_1 -Globulinfraktion ausmacht und 90 % der antitryptischen Aktivität im Blut stellt (75/76), vermag neben den Pankreasproteinasen Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein, auch leukozytäre und acrosomale sowie Bakterien- und Pilzproteinase zu hemmen.

Infolge seines großen Spezifitätsspektrums ist α_1A bei allen klinischen Fällen, die durch Proteinaseverbrauch charakterisiert sind, signifikant verringert. Es ist ein sogenanntes "akutes Phasenprotein". Das Verhältnis von aktivem proteinasegebundenem zu Gesamt- α_1A kann als Indikator für die Schwere des Entzündungsvorganges genommen werden. Serum-Trypsininhibitorspiegel-Messungen bei verschiedenen Krankheitszuständen, ausgeführt von Schön (74) und Kemp (52), lassen für den α_1 -Inhibitor besonders bei malignen

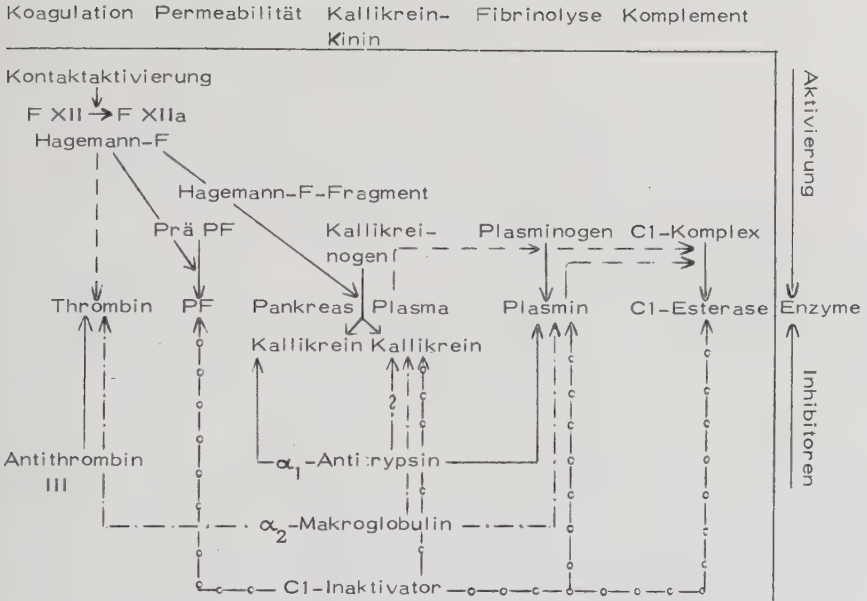


Abb. 1: Die Beziehung zwischen den verschiedenen Enzymsystemen des Blutes und der Regelfunktion der Inhibitoren (nach Heimbürger)

Erkrankungen, nach großen chirurgischen Eingriffen und bei Myokardinfarkt einen erheblichen Anstieg erkennen. Bei nephrotischen Erkrankungen kommt es dagegen zu einem Abfall des α_1A (48).

Von speziellem klinischen Interesse ist der von Eriksson und Laurell (14/58) als rezessiver Gendefekt aufgedeckte, ererbte Mangel an α_1A , der gehäuft mit emphysematösen Veränderungen der Lunge einhergeht. Man bringt dies mit der fehlenden Schutzwirkung gegenüber elastaseähnlichen Proteinasen der polymorph-nukleären Leukozyten in Verbindung (53). Die letzteren Enzyme

sind Mediatoren der Entzündung, greifen Basalmembranen an und wirken so autodestruktiv.

Aus der Abb. 1 ersieht man, daß α_2^M eine Regelfunktion auf das Gleichgewicht zwischen Koagulation, Fibrinolyse und Freisetzung von Kininen hat. Am bedeutendsten ist dabei seine Wirkung als Plasmininhibitor. Die Antiplasminkapazität des α_2^M entspricht dem ganzen verfügbaren Plasminogen (1).

Neben den aktiven Serinproteinasen bindet α_2^M viele andere Endopeptidasen aus Tieren, Pflanzen und Bakterien (3). Die Interaktion zwischen Inhibitor und Enzym ist dabei im Gegensatz zu den anderen Proteinaseinhibitoren offensichtlich irreversibler Natur. Die Peptidkettenspaltung im Komplex bewirkt eine lokale Konformationsänderung des Inhibitors, wodurch ein Entkommen der Proteinase sterisch verhindert wird. Allerdings bleibt die Esteraseaktivität der gebundenen Proteinase intakt und die Hemmung erfolgt nur gegenüber größeren Molekülen wie den natürlichen Proteinsubstraten.

Sehr hohe Konzentrationen an α_2^M findet man beim nephrotischen Syndrom (85), während kleinere Moleküle wie α_1^A , AT III, C1 INA wegen des massiven renalen Proteinverlustes vermindert sind. Erhöhte Spiegel ergeben sich noch bei anderen renalen Erkrankungen, bei Präeklampsie mit Proteinurie wie auch beim Diabetes mellitus (23/30/47) und bei verschiedenen Wachstumsstörungen wie sie in der Schwangerschaft, in der Kindheit (24/25), bei der Regeneration und bei der Tumorentstehung vorkommen.

Menschliches Plasma besitzt nur einen Inhibitor, der C1-Esterase inaktiviert. Seine physiologische Bedeutung wurde offensichtlich, als ein ursächlicher Zusammenhang zwischen angioneurotischem Oedem und C1 INA bei Fällen von erbtem Mangel an diesem Protein

erkannt wurde (10/72). Zugleich findet man beim erblich angio-neurotischen Oedem eine starke Erniedrigung der Hemmfähigkeit des Serums für Kallikrein (5/55). C1 INA ist nämlich ebenso wie α_1 A ein progressiver Hemmstoff für Plasmakallikrein. Weiterhin interferiert es mit dem Gerinnungssystem als Inaktivator von Faktor XIIa, XIa und IIa. Durch die Hemmung des aktivierten Hagemann-Faktors und seiner aktiven Fragmente blockiert der C1 INA das bedeutendste proteolytisch vermittelte Proteinsystem des menschlichen Plasmas in einer sehr frühen Phase. Faktor XII wird durch Kontakt mit fremden Oberflächen aktiviert. Er initiiert hierauf Koagulation, Fibrinolyse, Kallikrein- und Komplementaktivierung. Das Hagemann-Faktor-Fragment ist mit dem Präkallikrein-aktivator identisch und Kallikrein katalysiert die Aktivierung von Plasminogen über Faktor XIIa bzw. XIIa-Fragment durch Einwirkung auf Plasminogenaktivator; Plasmin wiederum triggert die Komplementreaktion.

Durch die Hemmung des Hagemann-Faktors und seiner Fragmente werden also alle vier Enzymsysteme blockiert.

Der dominante Thrombininhibitor des menschlichen Plasmas, AT III, inaktiviert auch den Gerinnungsfaktor Xa. Da AT III also teilweise bei der Gerinnung mitverbraucht wird, signalisiert eine Reduktion dieses Inhibitors einen hyperkoaglen, präthrombotischen Zustand. Man findet verminderte Spiegel an AT III bei der disseminierten intravasculären Gerinnung (64) und nach Unterdrückung der Antikoagulantientherapie (70). Ererbter Mangel an AT III (12/13) geht mit einem gesteigerten Vorkommen an Thromben einher (86). Dabei ist die Hemmkapazität gegen Konvertin in demselben Ausmaß verringert wie die gegen Thrombin (12/13).

Die exklusivste Plasmaantiproteinase ist α_1 Chymotrypsininhibitor, da sie nur dieses eine Enzym zu hemmen vermag.

D) Der Inter- α -Trypsininhibitor

Ein Glykoprotein, genannt Protein π , wurde von Steinbuch und Loeb 1961 erstmals aus menschlichem Plasma isoliert (80).

Heimbürger und Schwick zeigten, daß ein Protein, das sich in der Inter- α -Region (zwischen α_1 und α_2 -Globulinen) bewegte, eine Hemmaktivität gegen Trypsin hatte (33).

Heide und Mitarbeiter reinigten die aktive Komponente und nannten sie Inter- α -Trypsininhibitor (31).

Dieses Protein erwies sich später als identisch mit dem π -Protein.

1. Stabilität und andere Eigenschaften

Der ITI ist ein sehr instabiles Protein. Er dissoziiert leicht in zwei Komponenten mit Hemmfähigkeit und der veränderten S_{20}^W von 4,4 S. Diese Komponenten zerfallen spontan weiter in ein inaktives Protein und ein Polypeptid, das noch als Inhibitor wirksam ist (31).

Er ist eines der wenigen Plasmaproteine, die durch Erhitzen auf 56 Grad Celsius denaturiert und aggregiert werden (81). Das aggregierte Protein sedimentiert bei 19 S in der Ultrazentrifuge und seine Beweglichkeit in der Zonenelektrophorese entspricht annähernd dem des α_2 M. Das neu entstandene erhitzte Protein reagiert nur schwach mit dem entsprechenden Antiserum, die Antiproteinaseaktivität bleibt jedoch praktisch unverändert. Etwas aggregiertes Material wird häufig in gereinigten Präparaten beobachtet und ein kleiner Prozentsatz bildet sich auch nach Aufbewahren des ITI im gefrorenen Zustand (84).

ITI aus frischem Plasma zeigt oft einige Banden in der Polyacrylamid- und der Polyacrylamid/Agarose-Elektrophorese. Offensichtlich ist Proteolyse an der Heterogenität schuld, der genaue Grund ist jedoch ungewiß.

Der Inhibitor kann 2 bis 3 Wochen bei 4 Grad Celsius unter sterilen Bedingungen erhalten werden. Gefriertruhen sind möglich ohne Aktivitätsverlust, obwohl meist kleine molekulare Veränderungen vorkommen. (84).

2. Physikalische und chemische Eigenschaften

Das Molekulargewicht wurde anfänglich durch Ultrazentrifuge auf 180.000 bis 200.000 geschätzt (80). Heimbürger veröffentlichte dagegen kürzlich einen Wert von 160.000 (34), während Steinbuch mit SDS-Polyacrylamidelektrophorese-Untersuchungen auf 190.000 bis 200.000 kam (83).

Der ITI hat sehr charakteristische elektrophoretische Eigenschaften. In der Papier- und Zelluloseacetat-Elektrophorese nimmt er eine Inter- α -Stellung ein, was Ursache für seinen Namen ist. In Polyacrylamid, Acrylamid/Agarose und Stärkegel benimmt er sich wie ein Posttransferrin, indem er zwischen β_1 C- und β_1 A-Globulin zu liegen kommt, in der Immunelektrophorese präzipitiert er in der α_1 -Gegend (31/84).

Bei pH 8 ist er mit Rivanol, mit Perchlorsäure, Trichloressigsäure und Ammoniumsulfat präzipitierbar. Er hat einen Sedimentationskoeffizienten $S_{20,w}^{1\%} = 6,4$, und seine $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ bei 280 nm beträgt 7,1 (31).

Als Glykoprotein enthält er 3,4 % Hexosen, 3,5 % Hexosamine, 2,1 % Sialinsäure und 0,1 % Fucose. Die Aminosäurezusammen-

setzung nach Heimbürger (34) zeigt die Tabelle 1. Arginin ist der N-terminale Rest.

Zn^{2+} wurde sowohl in dem früheren Protein- π -Präparat gefunden wie im ITI. Atomabsorptionsanalysen von einigen ITI-Präparaten zeigen einen Zn^{2+} -Gehalt von 0,6 bis 0,95 Grammatom pro MG 190.000 (50/84).

Aminosäure	%	Aminosäure	%
Lysin	5,63	Alanin	3,37
Histidin	2,20	Halb-Zystin	1,69
Ammonium	1,44	Valin	5,86
Arginin	5,18	Methionin	2,00
Asparaginsäure	9,50	Isoleucin	3,91
Threonin	4,64	Leucin	7,40
Serin	4,87	Tyrosin	4,01
Glutaminsäure	11,97	Phenylalanin	5,00
Prolin	3,69	Tryptophan	1,69
Glycin	2,90	Kohlenhydrate	8,40
Summe = 95,35			

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung des ITI

3. Spezifität und Kinetik

Der ITI hemmt hauptsächlich Trypsin. Trypsin I von Figarella (17), das mit dem kationischen Trypsin von Mallory und Travis (62) identisch zu sein scheint, wird dabei weit weniger gehemmt als

menschliches Trypsin II (= anionisches Trypsin). Für den Komplex von ITI und menschlich kationischem Trypsin ergibt sich ein $K_i = 9 \text{ nM}$ (6).

Nach Heimbürger inaktiviert 1 mg Inhibitor je nach Herkunft 0,15 bis 0,2 mg Trypsin (31). Gemäß seiner niedrigen Konzentration macht der ITI allerdings nur 1 % der totalen antitryptischen Aktivität des Serums aus. Er gehört zur Gruppe der Trypsininhibitoren, die ein Arginin in ihrem aktiven Zentrum haben. Die Aktivität wird somit durch Veränderung der Guanidinogruppe zerstört. Bereits bei 30 % Veränderung der Arginine verschwindet die Aktivität, das immunologische Reaktionsvermögen des ITI nimmt ab (21).

Zum Hemmspektrum des ITI zählen weiterhin Chymotrypsin und Acrosin. Eine minimale Affinität des Inhibitors für Papain, Bromelin und Pronase ist außerdem nachgewiesen (82).

4. Verteilung des intakten Moleküls

Die normale Konzentration des ITI liegt zwischen 300 bis 500 mg pro Liter Plasma (35). Zusammen mit anderen Inhibitoren wird er auch im menschlichen Cervikalschleim gefunden, wobei die Spiegel in der nichtfruchtbaren Phase des Ovulationszyklus höher sind. Kürzliche Beobachtungen zeigen, daß Acrosininhibitoren wie der ITI die Spermienpenetration durch den Cervixschleim erschweren (77). Der ITI hemmt dabei Acrosin in einer unmittelbaren Reaktion (22).

5. Phylogenese

Beim Studium der Wechselwirkung zwischen menschlichen Plasma-antiproteinasen und den entsprechenden Proteinen im Tierplasma

ergab sich für den ITI des Gorilla gorilla und des Pantroglotydes vollständige immunologische Identität mit dem menschlichen Inhibitor, während eine teilweise Identität des ITI mit dem des Pongo Pygmaeus zu erkennen war.

Das phylogenetische Alter der antigenetischen Strukturen des ITI, der neben IgA und IgD zur immunologischen Evolutionsgruppe IEG I zählt, muß also in etwa das des "letzten gemeinsamen Vorfahren" von Mensch und Pongiden sein (4).

6. Beziehung zu anderen Inhibitoren

6.1. Säurestabile Derivate im Serum und Urin

Durch Untersuchungen von Peanasky und Laskowsky (66) und Shulman (79) ist bekannt, daß nach Deproteinisierung von Blutplasma etwa 3 % der insgesamt im Plasma vorhandenen antiproteolytischen Aktivität im Überstand verbleiben.

Reichert man diese antiproteolytische Aktivität aus dem Enteiweißungsüberstand von Serum mit konventionellen Methoden an, so findet sich ein säurestabiler Proteinaseinhibitor mit einem aus seiner spezifischen Aktivität errechneten MG von 30.000 und einem hohen Kohlenhydratanteil.

Physiologischerweise kommt er im Serum in freier, nicht komplexierter Form vor. Er zeigt eine immunologische Kreuzreaktion mit dem monovalenten, säurestabilen und hochmolekularen humoralen ITI (44).

Der säurestabile Hemmstoff ist jedoch gegenüber überschüssigen Proteinasen empfindlich. Ein Überschuß an Trypsin bewirkt durch Abspaltung von Peptidketten, die für die antiproteolytische Wirkung nicht notwendig sind, über einen Trypsin-Inhibitor-Komplex die Entstehung eines Inhibitors mit einem MG von 14.000, der allerdings

noch immunologische Identität zum ITI zeigt, Derselbe unphysiologische Hemmstoff ergibt sich auch direkt bei der Trypsinbehandlung von nativem und enteiweißtem Serum wie ITI-Präparaten (44). Die chemischen und immunologischen Eigenschaften des durch Trypsin freisetzbaren Inhibitors sind darüberhinaus identisch mit den Eigenschaften des bereits früher aus dem Enteiweißungsüberstand von Serum durch Affinitätschromatographie an trägergebundenem Trypsin isolierten Serum-inhibitors mit MG von 22.000 (40).

Diese Ergebnisse bedeuten, daß der hochmolekulare humorale ITI als Vorstufe sowohl für den physiologischen säurestabilen Serum-hemmstoff (= I-30) als auch für den durch enzymatische Wirkung von Trypsin freisetzbaren kleineren Inhibitor (= I-14) anzusehen ist. Das Hemmzentrum des Moleküls liegt somit offenbar in einer relativ kleinen stabilen Zone, die gegenüber proteolytischem Abbau resistent ist. Im Gegensatz zur Vorstufe sind der I-30 und sein unphysiologisches Derivat schwache Trypsin- und sehr schwache Chymotrypsin-Inhibitoren.

Bemerkenswerterweise korreliert die Menge an freigesetztem Inhibitor jeweils mit den ITI-Spiegeln in den eingesetzten Seren oder mit der Menge des Precursors in den ITI-Präparaten. Die durch Trypsin freisetzbare Inhibitormenge kann daher als Maß für den vorhandenen Proinhibitor verwendet werden (44/45).

Als physiologisches "inhibitor liberating enzyme" kommt Trypsin jedoch nicht in Frage. Einerseits ist diese Pankreasproteinase im Serum gar nicht vorhanden, andererseits bildet sie mit dem Inhibitor inaktive Komplexe, aus denen erst durch Denaturierung des Enzyms aktive Inhibitoren (I-14) freigesetzt werden können. Gegenwärtig wird Elastase aus PMN-Leukozyten für die permanente limitierte intravasale Proteolyse des I-30 aus dem ITI verantwortlich gemacht.

Diese Proteinase wird weder vom Proinhibitor noch vom freigesetzten Produkt gehemmt (Hochstraßer, unveröffentlicht).

Der Serum-inhibitor ist das erste Beispiel eines Proteinaseinhibitors, der aus einem Proinhibitor freigesetzt werden kann. Ohne Veränderung der chemischen und physiologischen Eigenschaften wird er in den Urin sezerniert (8.000 - 22.000 mU/Tag) (42). Dort ist er mit dem im Harn vorkommenden, bereits von Astrup als Mingin beschriebenen (2) und von Proksch (68) in immunologische Beziehung zum ITI gebrachten säurestabilen Urintrypsininhibitor identisch.

Da bekanntlicherweise viele Schleimmembranen durch sezernierte Inhibitoren gegen Proteasen geschützt werden, nimmt man für den Urininhibitor eine ähnliche physiologische Funktion in den Tubuli, der Urethra und der Blase an.

Strukturelle Ergebnisse:

Die Sequenzierung des Serum- bzw. Urininhibitors ergibt ein überraschendes Ergebnis. Nach Abspaltung des für die Hemmwirkung nicht essentiellen Molekülteils verbleibt ein Inhibitormolekül, das aus zwei kovalent verbundenen homologen Kunitztypdomainen zusammengesetzt ist, wobei jedoch nur eines inhibitorisch aktiv und das andere infolge einer Mutation an der aktiven Stelle hemm-inaktiv ist.

Analoge Untersuchungen an entsprechenden Inhibitoren aus Rinderserum ergeben große Homologien zum entsprechenden menschlichen Inhibitor. Das aktive Domain ist jedoch nicht identisch mit den bereits bekannten Kunitztypinhibitoren des Rindes (aus Lunge = Trasylo^Rl).

Aufgrund der Ergebnisse muß angenommen werden, daß das Gen für die Produktion von Kunitzinhibitoren bei höheren Organismen in mehreren Varianten vorhanden sein muß (Hochstraßer und Wachter 1977).

6.2. ITI- und I-30 bei pathologischen Zuständen

Der physiologischerweise im Plasma in sehr engen Grenzen gehaltene I-30-Spiegel von 5 bis 10 mU/ml ist bei verschiedenen pathologischen Bedingungen, wo er beträchtlich anzusteigen vermag, von besonderer Bedeutung.

Im Serum von Patienten mit Nephropathien unterschiedlicher Genese nimmt der infolge seiner glomerulären Filtration als endogenes harnpflichtiges Stoffwechselprodukt aufzufassende Inhibitor proportional zur Kreatininkonzentration zu und kann Werte vom 20fachen der Norm erreichen. Die Aussagekraft der Serum-inhibitorspiegel wird belegt an Fällen, bei denen die Kreatininkonzentration im Serum am oberen Normwert liegt, die Inhibitorenkonzentration aber durchwegs noch um das zwei- bis dreifache der Norm erhöht ist (42).

Eine hierzu parallel erwartete Abnahme der Proinhibitorkonzentration läßt sich nicht feststellen. Im Gegenteil ist bei kompensierter Retention ein diskreter, bei Urämie ein deutlicher ITI-Anstieg nachweisbar. Die Niere ist somit als Hauptumsatzorgan für das System Proinhibitor-Inhibitor zu betrachten. Bei Nephropathien ist der Umsatz eingeschränkt und es resultiert ein Anstieg der Proinhibitorkonzentration. Die feststellbare Konzentrationserhöhung des Metaboliten ist dagegen Ergebnis der eingeschränkten glomerulären Filtration des außerhalb der Niere freigesetzten I-30 (45).

Bei einer Reihe weiterer untersuchter Erkrankungen läuft der ITI-Abbau beschleunigt ab. Dies zeigt sich in bestimmten Fällen durch eine Konzentrationsabnahme des ITI oder durch eine Konzentrationszunahme des freigesetzten Inhibitors an (45).

Nach Nierentransplantationen erlauben Veränderungen der Serumspiegel und der Ausscheidung des säurestabilen Inhibitors frühzeitige Aussagen über den funktionellen Zustand des Transplantates. Die Funktionsaufnahme kündigt sich an durch den rapiden Abfall der Seruminhibitorkonzentration und durch die massive Ausscheidung der Inhibitoren bei noch hoher Kreatininkonzentration im Serum. Eine Abstoßungskrise wird durch frühzeitigen Anstieg der Seruminhibitorkonzentration angezeigt (16/43).

Früh- und Neugeborene mit entzündlichen Erkrankungen verschiedener Genese weisen mit einer Häufigkeit von 70 - 80 % der Fälle einen erheblichen Mangel an ITI auf, wobei in allen Fällen normale Spiegel für den wichtigsten Seruminhibitor α_1A gefunden werden. Offensichtlich ist die Syntheserate für ITI im frühen Kindesalter noch nicht voll ausgeprägt, so daß hier bereits bei geringgradigen Entzündungen ein enormer Proinhibitorverbrauch nachweisbar wird.

6.3. Säurestabile Derivate im Respirationstrakt

Hochstraßer und Mitarbeiter haben die antitryptische Aktivität in Sekreten des oberen Respirationstraktes von Menschen verfolgt (36). 20 % der totalen Aktivität konnten dem α_1A zugeteilt werden und 80 % der Anwesenheit von wenigstens zwei säurestabilen niedermolekularen Inhibitoren. Die MG dieser Inhibitoren wurden mit 22.000 und 14.000 (= Bronchialsekretinhibitor) bestimmt (39).

Neben der Hemmung der Pankreasproteinasen Trypsin und Chymotrypsin sind sie mit der spezifischen Fähigkeit, Leukozytenproteinasen zu inaktivieren, ausgestattet (37). Ihre wichtigste physiologische Funktion dürfte deshalb die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen Proteinase und Inhibitor sein.

Die Tatsache, daß Eiteiweißung die Inhibitoraktivität des Schleims erhöht, beweist, daß in situ eine Komplexbildung zwischen Inhibitor und Leukozytenproteinasen im Respirationstrakt besteht. Die Menge an komplexiertem Inhibitor in den Sekreten korreliert dabei mit der Stärke der entzündlichen Reaktion (71).

Beide Sekretinhibitoren besitzen reaktive Argininstellen und vom ITI nicht unterscheidbare Antigen determinanten (38).

Diese speziellen Antigeneigenschaften haben sie mit den säurestabilen Hemmstoffen aus Serum und Urin gemeinsam. Angesichts der verschiedenen Hemmspektren, MG und Peptidmuster sind die Inhibitoren jedoch nicht identisch (41).

6.4. Säurelabile Derivate

Bei der in vitro-Freisetzung des säurestabilen Serum-Trypsin-Plasmin-Inhibitors durch Kallikrein aus dem ITI entstehen zusätzlich noch mindestens zwei säurelabile Abbauprodukte, die ebenfalls mit Antikörpern gegen ITI reagieren (7). Auch bei der zweidimensionalen immunoelektrophoretischen Darstellung von ITI im Serum findet man regelmäßig neben dem Hauptpräzipitat wenigstens zwei weitere Präzipitate.

Das säurelabile Hauptabbauprodukt mit einem MG von 100.000 wird im Gegensatz zum säurestabilen Inhibitor nicht glomerulär filtriert. Bei gesunden Personen läßt sich in der zweidimensionalen Immunoelektrophorese dem intakten ITI eine definierte Menge an säurelabilem Abbauprodukt zuordnen.

Kranke mit Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention zeigen eindeutig eine Zunahme der Konzentration des säurelabilen Abbauproduktes, die wiederum mit einem Anstieg des säurestabilen I-30-Spiegels korreliert. Bei Kranken mit Leberzirrhose sieht man eine deutliche Konzentrationszunahme des säurelabilen Derivates bei erniedrigter ITI-Konzentration, wobei keine gleichzeitige Erhöhung des säurestabilen Inhibitors festzustellen ist.

Dies bedeutet, daß trotz erniedrigten ITI-Spiegels ein gesteigerter ITI-Umsatz stattfindet. Das gleiche Resultat ergeben die Befunde bei Sepsis und bei Bronchitikern, bei denen nur anhand der Konzentrationserhöhung des säurelabilen Derivates auf einen eindeutig erhöhten ITI-Umsatz zu schließen ist.

Der Anstieg des säurelabilen Metaboliten im Serum gestattet somit, bei verschiedenen Erkrankungen einen erhöhten ITI-Umsatz nachzuweisen, bei denen die Bestimmung des intakten ITI oder des filterbaren säurestabilen Derivates keinen solchen Nachweis zuläßt.

In speziellen Fällen von Niereninsuffizienz ist ein zusätzlicher Anstieg des I-30 infolge eingeschränkter glomerulärer Filtration zu beobachten (11/46).

7. Verfahren zur Isolation von ITI

Protein π wurde ursprünglich durch Chromatographie von Plasma auf DEAE-Zellulose bei pH 5 isoliert (80), während ITI durch verschiedene Ausfällungen mit Rivanol, Ammoniumsulfat und Äthanol erhalten wurde (31).

Unten sind zwei Reinigungsverfahren angegeben, das eine (7.1) aus frisch recalcifiziertem Plasma, das andere (7.2) mit Cohn-Fraktion III (84) als Ausgangsmaterial.

7.1. Methode nach Heimbürger (34/29)

Frisches Plasma wird durch Zusetzen von 12 ml 1,3 M CaCl_2 zu 1 l Ausgangsmaterial recalcifiziert. Das Fibrin wird durch Filtration entfernt. Das erhaltene Serum wird dann mit einer gleichen Menge Wasser verdünnt.

Anschließend fügt man 30 g nasse DEAE-32 Zellulose zu jedem Liter des verdünnten Serums hinzu. Nach Adsorption wird die Zellulose auf einem Büchnerfilter gesammelt, fest mit 0,02 M Phosphatpuffer gewaschen und dann in eine Säule gegossen. Zur Elution der Proteine mittels eines linearen Gradienten verwendet man einen Na-Phosphatpuffer pH 6,9, dessen Ionenstärke von 0,02 M bis 0,4 M ansteigt.

Ionenaustauschchromatographie erlaubt die Trennung von C_1INA vom ITI. Die ITI enthaltenden Fraktionen werden dann gesammelt und 1,8 M Ammoniumsulfat wird zugesetzt. Das Sediment wird in einer minimalen Menge an 0,15 M NaCl gelöst und einer Gelfiltration auf einer G-150 Sephadexsäule unterzogen.

7.2. Methode nach Steinbuch (83/84)

Diese Methode verwendet entweder Fraktion III als Ausgangsmaterial oder ACD-Plasma

Im letzteren Fall werden 1,5 g EDTA pro Liter Plasma zugesetzt, der pH wird auf 5 eingestellt und die Proteinkonzentration wird durch Verdünnung mit 0,1 M Acetatpuffer pH 5 auf 2,5 ‰ gebracht.

Fraktion III ist ein Produkt, erhalten aus einer modifizierten Nitschmann-Technik (63/84). Da das Präzipitat aus Fraktion III Äthanol enthält, muß es kalt gehalten und ohne Aufschub verarbeitet werden (Abb. 2).

Ein Kilogramm Fraktion III wird in 4,6 Liter eines 0,1 M Acetatpuffers, der 1,5 g/l EDTA enthält, gelöst, um eine Lösung von ungefähr 25 g Protein/l zu erhalten. DEAE-Zellulose wird mit 0,1 M Acetatpuffer pH 5 äquilibriert und 1,5 g des nassen Materials werden zu jedem Gramm Protein hinzugefügt. Unter dauernder Bewegung führt man 20 Minuten lang eine Batch-Adsorption durch. Hierauf wird die Zellulose durch Zentrifugation entfernt, zweimal in 0,2 M Acetatpuffer pH 5 gewaschen, in eine Säule geschüttet und mit 0,4 M Acetatpuffer, der 1,5 g/l EDTA enthält, eluiert. Der ITI im Eluat wird mit 30%igem Äthanol bei einer Temperatur von -5 Grad Celsius präzipitiert. Das Sediment wird sofort in 0,15 M NaCl bei pH 7 gelöst, gegen 0,2 M EDTA enthaltenden Acetatpuffer mit pH 5 dialysiert und einer Gelfiltration auf einer Sephadex G-150 Säule unterzogen.

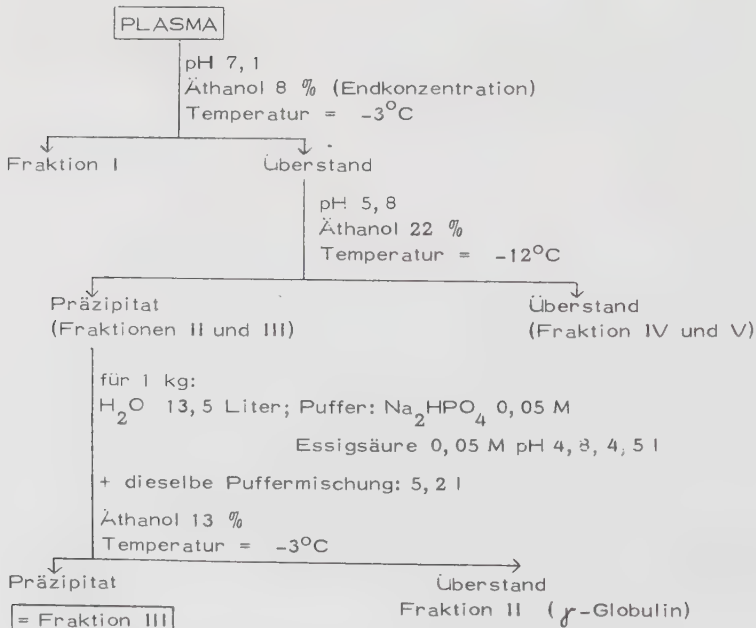


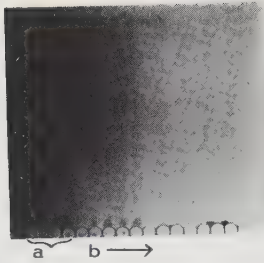
Abb. 2: Präparation von Fraktion III durch eine modifizierte Nitschmann-Technik (63)

III. ERGEBNISSE DER EINZELNEN VERSUCHSABSCHNITTE

Zur Isolierung von ITI aus nativem Serum wird Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Zellulose durchgeführt. Hier und bei allen folgenden Arbeiten ist der jeweilige Puffer zum Schutze des labilen Hemmstoffes mit 10^{-4} M antiproteolytisch wirkendem Benzamidin versetzt. Sämtliche Aufbereitungen erfolgen außerdem unter Kühllhaltung.

Zu Beginn der Chromatographie wird die Hauptmasse des säurelabilen Inhibitors aus den aufgetragenen 250 ml Serum an den Austauscher adsorbiert. Nur eine geringe Menge einer Substanz, die mit monovalentem ITI-Antiserum Präzipitate bildet, wird mit dem Serumdurchlauf und dem Ausgangspuffer ausgewaschen (Abb. 3). Der gebundene Anteil läßt sich mittels eines linearen Ionenstärkegradienten wieder von der Zellulose separieren und erscheint im Eluat (Abb. 4). Die Testung der Fraktionen dieses Eluates auf ITI-Material mit einer Elektroimmundiffusion nach Laurell veranlaßt die Vereinigung mehrerer aufeinander folgender Fraktionen zu zwei getrennten Volumina (Abb. 5). Der vordere Teil enthält mit ziemlicher Sicherheit den ITI, wofür die scharfen Immunpräzipitate der einzelnen Fraktionen und ihre Anordnung in Form einer Gauss-Kurve sprechen. Zudem stimmen die Lage und Konzentrationsanhäufung der Präzipitate mit der Intensitätsverteilung der ITI-Banden bei der Polyacrylamidgelelektrophorese der Eluatfraktionen überein (Abb. 6).

Der hintere Teil wird noch entsprechend der von vorne fortgesetzten Gauss-Kurve ITI enthalten. Das Flachgel zeigt sogar schwache Banden in ITI-Position. Bei der Elektroimmundiffusion weisen die zwei bzw. drei übereinandergeschichteten Präzipitate pro un-



Aufgabe: je 8 μ l

Abb. 3:

Elektroimmundiffusion nach Laurell
gegen monovalentes ITI-Antiserum
von Kaninchen:

- Serumdurchlauf zu Beginn der Ionenaustauschchromatographie (4 Töpfe)
- anschließende fraktionierte Elution mit Startpuffer (0,05 M TRA-Puffer pH 8,6)

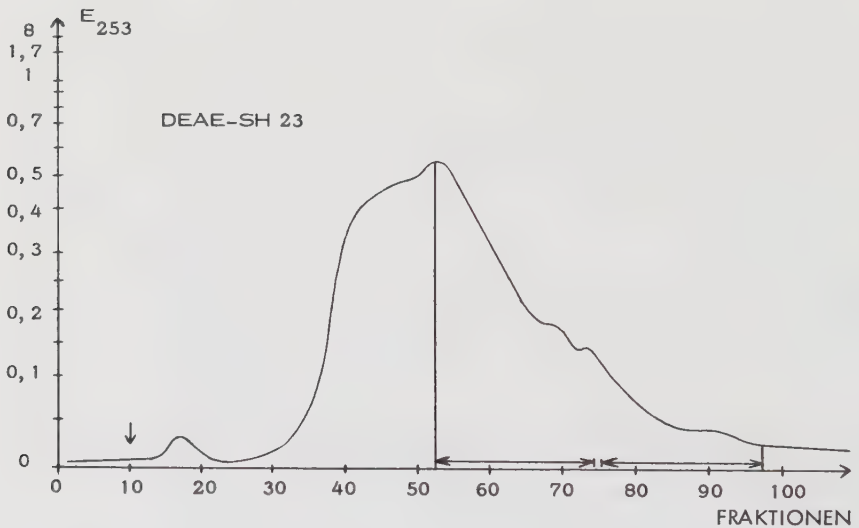


Abb. 4:

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Zellulose SH 23 zur

Isolierung von ITI aus nativem Serum (aufgetragen: 250 ml):

Säule: 30 x 360 mm, Fr. à 25 ml, 2 Fr./h, niedere Temp.

↓ Beginn des linearen Gradienten: je 1250 ml 0,05 M TRA-Puffer + 0,0 M NaCl → " + 0,25 NaCl, pH 8,6

Fr. 52-97: Kreuzreaktion mit ITI-AS v. Kaninchen

← Vereinigung zu einem Präparat für die weitere Verarbeitung, siehe auch Abb. 5 und Abb. 6

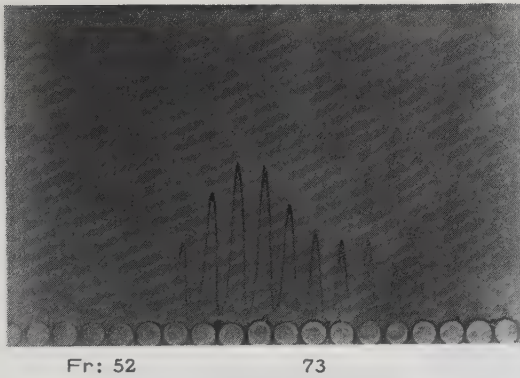


Abb. 5:

Elektroimmundiffusion nach Laurell gegen monospezifisches
ITI-Antiserum von Kaninchen:
Gradienteneluat der Chromatographie auf DEAE-Zellulose
Fr. 40 - 97 (jd. 3.Fr.), Aufgabe 8 μ l

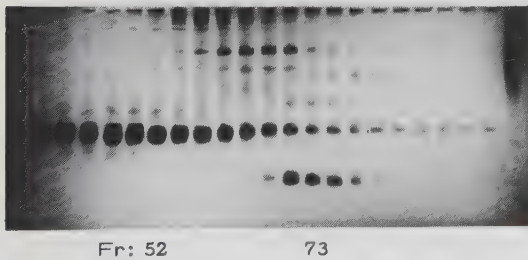


Abb. 6:

Polyacrylamid-Gelelektrophorese des DEAE-Gradienteneluates:
Fr. 37 - 97 (jd. 3.)
Aufgabe: je 25 μ l + 5 μ l Saccharose/Bromphenolblau
Letzter Schlitz: ITI-Vergleich 10 μ l (2,2 %, Behringwerke)

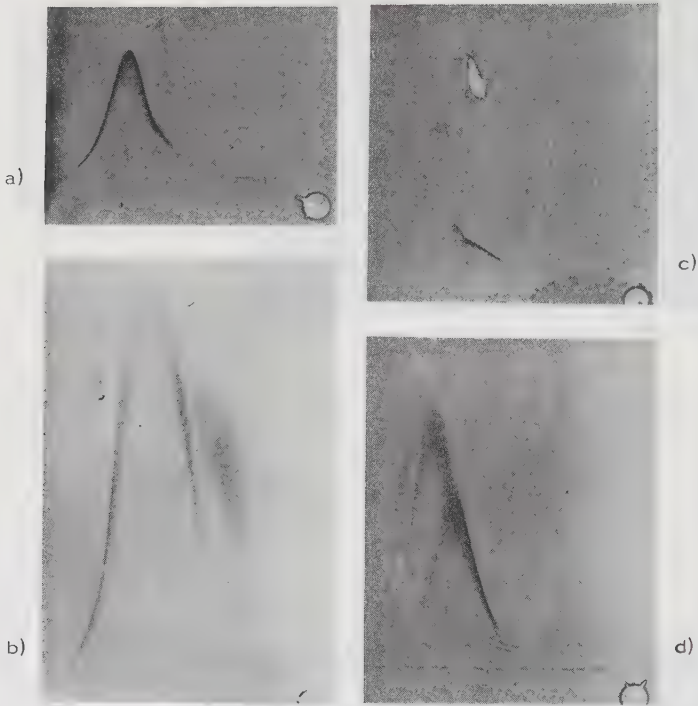


Abb. 7:

Zweidimensionale Immunelektrophoresen (gegen ITI-AS v. Kaninchen) vom:

- a) Konzentrat des ITI-Rohmaterials aus dem vorderen Teil der Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Zellulose (Fr. 52 - 74)
- b) Sediment dieses Konzentrates nach $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ -Fällung
- c) Konzentrat des heterogenen Materials aus dem hinteren Teil der Chromatographie auf DEAE-Zellulose (Fr. 75 - 97)
- d) Sediment dieses Konzentrates nach $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ -Fällung

Aufgabe: je 8 μl

tersuchter Fraktion jedoch auf die Anwesenheit weiterer mit ITI-Antiserum kreuzreagierender Komponenten hin (Abb. 5).

Die Acrylamidgelelektrophorese gibt zusätzlich einen Hinweis auf die Unmenge der nach der Chromatographie noch vorhandenen Serumproteine. Daher werden die beiden Präparate aus der DEAE-Chromatographie nach Einengung als weiteren Schritt mit 2,15 M Ammoniumsulfat gefällt und zentrifugiert. Welch enorme Anreicherung die zwei Konzentrate durch den Aussalzungsprozeß erfahren haben, veranschaulichen zweidimensionale Immunelektrophoresen, auf die zum Vergleich jeweils gleiche Substanzmengen aufgetragen wurden (Abb. 7 a-d).

Anschließend werden die Sedimente in je 10 ml 0,05 M Na-Acetatpuffer gelöst und einzeln der Gelfiltration unterworfen (Abb. 8 = A-5ml und Abb. 9 = A-5mlI). Die Fraktionen des filtrierten Materials werden wiederum mittels Elektroimmundiffusion nach Laurell gegen monovalentes ITI-Antiserum und mit Polyacrylamidelektrophoresen auf ihren Gehalt an ITI bzw. an Substanzen mit denselben antigenen Eigenschaften untersucht.

Das immunelektrophoretische Bild von A-5ml (Abb. 10) zeigt in seiner Gesamtheit zwei verschieden gestaltete Peaks, die ineinander übergehen. Ein vorderer ziemlich konzentrierter Peak stellt sicher den reinen ITI dar. Der hintere führt bestimmt noch ITI von vorne mit, aber auch etwas anderes. Die Präzipitate steigen hier nochmals an; würden sie nur von ITI gebildet, müßten sie weiter abnehmen. Von ihren Gipfeln gehen "Rauchwolken" aus, die ebenso am vorderen DEAE-Peak - dem ITI-Rohmaterial - auffallen (Abb. 5). Möglicherweise hat die Gelfiltration eine Trennung vom ITI bewirkt, so es sich bei diesen diffusen Präzipitaten nicht um ein bloßes Artefakt handelt.

Das Flachgel von A-5ml (Abb. 11) bestätigt bzw. ergänzt die Immunelektrophorese. Dem vorderen Peak entsprechen im Gel intensivste ITI-Banden. Das Filtrat ist, wie hier sichtbar wird, nur mehr vernachlässigbar gering mit anderen Serumproteinen verunreinigt.

Der A-5ml-Lauf des hinteren Mehrkomponentenmaterials der DEAE-Gradientenelution zeigt bei der Elektroimmundiffusion ebenfalls zwei Peaks (Abb. 12). Der vordere besteht aus mindestens drei, wenn nicht vier "übereinandergelagerten", d.h. infolge unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit verschieden weit gelaufenen Präzipitaten. Eines hiervon ist gemäß seiner Herkunft aus der Chromatographie auf DEAE-Zellulose wahrscheinlich noch ITI. Kein ITI dürfte dagegen mehr im hinteren Peak enthalten sein, denn sowohl bei der Elektrophorese als auch im Elutionsdiagramm zeigt er sich vom vorderen scharf abgesetzt.

Seltsam ist, daß bei der Gelelektrophorese gerade dieser zweite Peak von A-5ml im Bereich des ITI zu liegen kommt (siehe vor allem Fr. 66 in Abb. 13). Nachdem dieses chromatographische Verfahren eine Trennung nach Ladung und Größe bewirkt, müßte die hier zum Stillstand gekommene Substanz eine umso niedrigere Ladung als der ITI haben, setzt man entsprechend ihrem Erscheinen während der Gelfiltration ein geringeres Molekulargewicht voraus.

Der erste Peak, der noch Proinhibitor enthalten kann, bildet im Flachgel in der Position des ITI tatsächlich noch eine minimale Bande aus. Von Interesse ist hier allerdings eine intensiv ausgeprägte weitergelaufene Bande. Vergleicht man die Gelelektrophorese mit der zugehörigen vom hinteren Teil des DEAE-Gradienten (Fr. 74 und folgende in Abb. 6), so wird deutlich, daß die Gelfiltration die

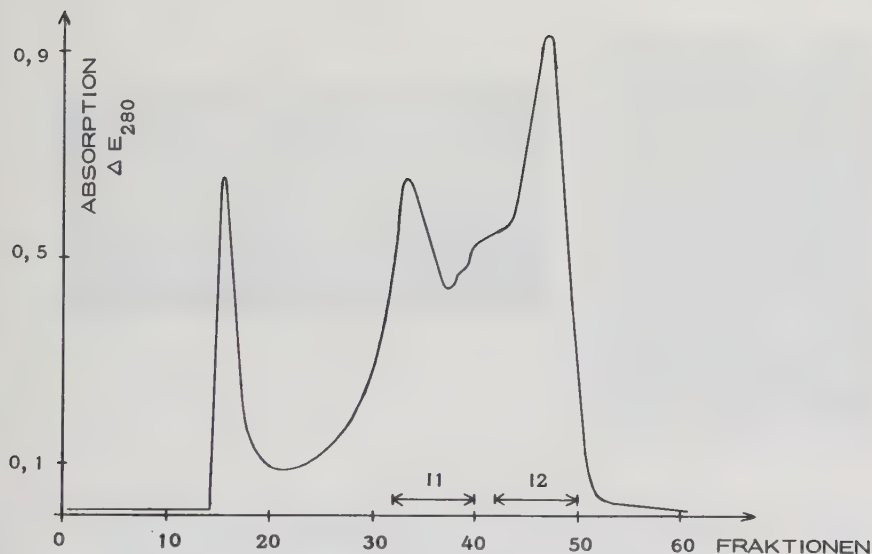


Abb. 8:

Gelfiltration auf Biogel A-5m von ITI-Rohmaterial (= DEAE-Gradientenfractionen 52 - 74) = A-5ml

Säule: 26 x 1750 mm, Fr. $\hat{a}$ ~ 18,5 ml,

Puffer: 0,05 M Na-Acetatpuffer pH 6,0 + 10^{-4} M Benzamidin

↔ Vereinigung der Fraktionen zu einem Präparat entsprechend dem Testergebnis aus Elektroimmundiffusion n. L. und Polyacrylamid-Gelelektrophorese (= I1 u. I12)

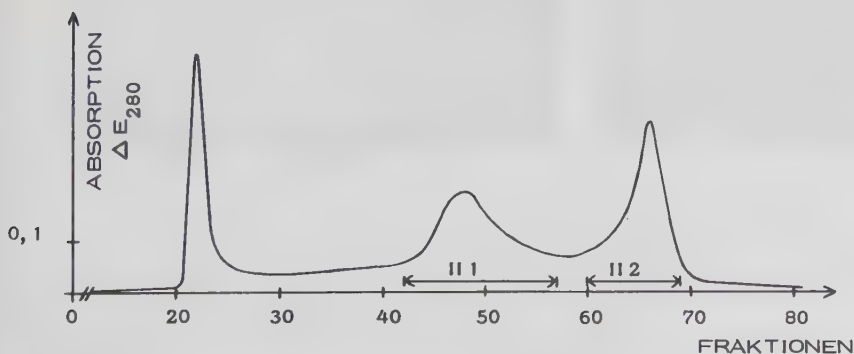


Abb. 9:

Gelfiltration auf Biogel A-5m des hinteren DEAE-Präparates mit ITI-Antigenität (= Fr. 75 - 97) = A-5mlI

Säule: 26 x 1750 mm, Fr. $\hat{a}$ ~ 13,5 ml,

Puffer: 0,05 M Na-Acetatpuffer pH 6,0 + 10^{-4} Benzamidin

↔ s.o. (= II1 u. II2)



Abb. 10:

Elektroimmundiffusion nach Laurell (gegen ITI-AS) von A-5mI

Aufgabe: je 8 μ l, jd. 2. Fr. ist getestet

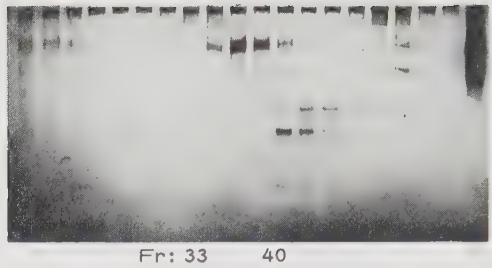


Abb. 11:

Polyacrylamid-Gelelektrophorese von A-5mI: Fr. 18 - 54 (jd. 2.)

Aufgabe: wie Abb. 10; letzter Schlitz: ITI-Vergleich

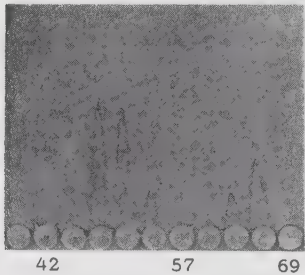


Abb. 12:

Elektroimmundiffusion nach Laurell (gegen ITI-AS) von A-5mII

Aufgabe: je 8 μ l, jd. 3. Fr. ist getestet

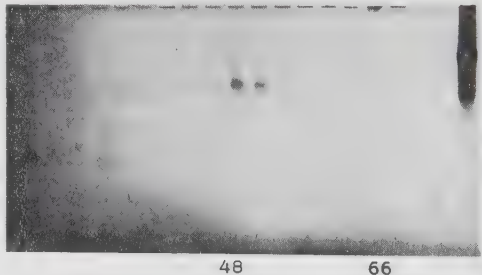


Abb. 13:

Polyacrylamid-Gelelektrophorese von A-5mII

Aufgabe: wie Abb. 12; letzter Schlitz: ITI-Vergleich

Trennung dieser anodischeren Komponente von der oben erwähnten langsameren in ITI-Position erreicht hat.

Die jeweiligen peakbildenden Fraktionen von A-5mI (= I1 und I2) wie von A-5mII (= II1 und II2) werden vereinigt und konzentriert.

Im Trypsinhemmtest und bei der Fibrinagarelektrophorese (Abb. 14) stellt sich heraus, daß erstaunlicherweise alle vier Stoffe erhebliche Hemmaktivität und die gleiche antitryptische Aktivität besitzen. Sie zeigen also nicht nur immunologische Identität mit dem ITI, sie repräsentieren auch aktive Trypsininhibitoren. Die Inhibitorkapazitäten sind der Tabelle 2 zu entnehmen, ebenso die ImU/ml Lösung nach I-14-Freisetzung durch Incubation mit Trypsinüberschuß und nach Perchlorsäurefällung im Enteiweißungsüberstand.

	I1 = ITI	I2	II1	II2
ImU/ml	142	54	96	56
ImU/ml I-14-Freisetzung	255	104	61	44
ImU/ml säurestabiler Entei- weißungsüberstand	0	53	18	9

Tabelle 2: Inhibitorkapazitäten

Zweidimensionale Immunelektrophoresen der vier Präparate (Abb. 15) lassen anhand der Immunpräzipitate genauer als bisher ablesen, wieviele verschiedene Komponenten mit ITI-AG-Eigen-

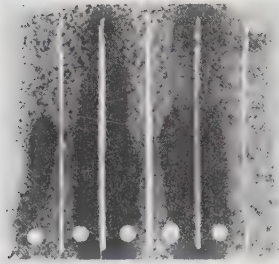


Abb. 14:

Fibrinagarelektrophorese:

von links nach rechts: Serum,

II = ITI, II2, II1

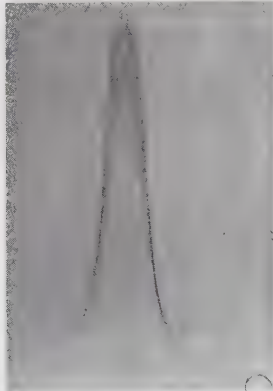
Aufgabe: je 8 Units

1., 3., 5. Kanal: Trypsinlösung (0,01 %)

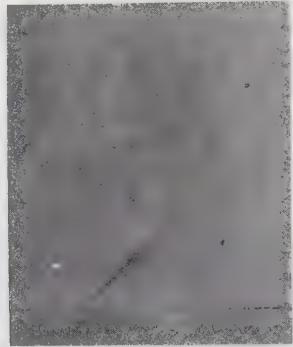
2. u. 4. Kanal: ITI-Antiserum

Die Stellung des ITI bzw. der anderen ITI verwandten Inhibitoren ist durch AG-AK-Präzipitate gekennzeichnet. Wo sich aktiver Inhibitor befindet, wird die Hydrolyse von Fibrinogen gestoppt.

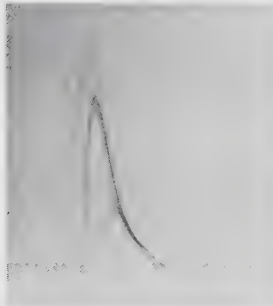
II = ITI



II2



II1



II2



Abb. 15:

Zweidimensionale Immunelektrophoresen (gegen ITI-AS):

II = der aus Serum isolierte ITI

II2, II1, II2 = die drei weiteren nach Chromatographie und Gel-filtration erhaltenen Präparationen mit gleicher immunologischer Identität

schaften enthalten sind. Das Präparat I 1 bildet mit ITI-Antiserum eindeutig nur einen einzigen, stark konturierten und symmetrischen Antigen-Antikörper-Komplex, es besteht somit zweifellos aus dem zu isolierenden homogenen ITI.

Um die Bestandteile der anderen Substanzen noch näher zu charakterisieren, wird jeweils eine definierte Menge der vier Materialien mit einem Überschuß an Trypsin versetzt, und nach Inkubation einerseits mit Ovomukoid abgeblockt, andererseits mit Perchlorsäure enteiweißt.

Diese beiden Aufbereitungen, dazu das entsprechende Nativpräparat und sein Enteweißungsüberstand werden eindimensionalen Immunelektrophoresen unterzogen (Abb. 16).

Zur Wirkung von Trypsin auf den ITI sei nochmals gesagt, daß es über einen intermediär gebildeten Trypsininhibitor-Komplex TI-14 den säurestabilen I-14 freisetzt, wozu das Enzym allerdings erst denaturiert werden muß. Der TI-14-Komplex hat bei der Elektrophorese im Gegensatz zum freien I-14 eine verminderte Beweglichkeit, da das im Komplex gebundene Trypsin ein kationisches Protein ist.

Dementsprechend sind auf der eindimensionalen Immunelektrophorese des ITI-Präparates II bei der Behandlung mit Trypsin-Überschuß und folgender Abblockung mit Eierinhibitor die I-14-Komplexe, bei anschließender Enteweißung dagegen der I-14 präzipitiert. Letzterer und seine Komplexe sind an der zum ITI entgegengesetzten Laufrichtung erkennbar.

Da diese Arbeiten nicht sofort im Anschluß an die vorhergehenden erfolgt sind, ist das ursprünglich reine Nativpräparat, was ja die zweidimensionale Elektrophorese bezeugt hat, trotz Aufbewahrens im gefrorenen Zustand bereits spontan modifiziert. Laut Steinbuch bildet sich bei Konservierung im gefrorenen Zustand zum Beispiel immer ein kleiner Prozentsatz an aggregiertem ITI (84).

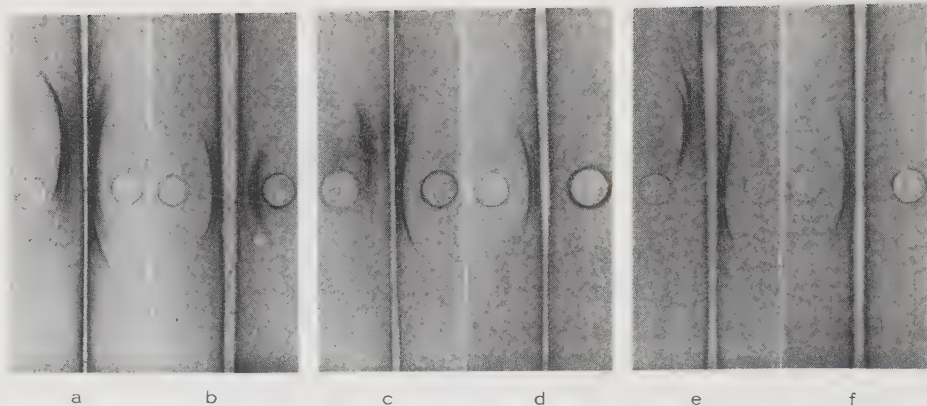


Abb. 16: Eindimensionale Immunelektrophoresen gegen ITI-Antiserum von Kaninchen (immunisiert im Labor von Professor Hochstraßer)

- | | | | |
|----|--------------------|--|--|
| a) | Präparat I1 = ITI: | links: nativ | |
| | | rechts: Trypsinüberschuß + Ovomuroid | |
| b) | " | links: Trypsinüberschuß + Enteiweißung | |
| | | rechts: Enteiweißungsüberstand des Nativpräparates | |
| c) | Präparat I2: | wie a) | |
| d) | " | wie b) | |
| e) | Präparat II1: | wie a) | |
| f) | " | wie b) | |

Aufgabe: je ca. 8 Einheiten

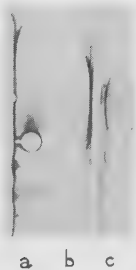


Abb. 17:

Eindimensionale Immunelektrophorese gegen ITI-AS von Präparat II2:

- | | | |
|----|---|-------------|
| a) | I-30 Vergleich: | 9 Einheiten |
| b) | Incubation mit Trypsinüberschuß: | 8E |
| c) | Incubation mit Trypsinüberschuß + Abblockung mit Eierinhibitor: | 8E |

Es darf daher nicht verwundern, wenn nach der Perchlorsäure-fällung des an sich säurelabilen ITI säurestabile Präzipitate zum Vorschein kommen.

Das Material I2 läßt sich mit Trypsin ebenfalls in I-14-Komplexe und in I-14 überführen. Berücksichtigt man die Herkunft aus dem vorderen Teil des DEAE-Gradienten, so muß dieser I-14 auch aus ITI herkommen. Das zweite Präzipitat, das bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese auffällt, mag von einer säurelabilen Substanz herrühren.

III bildet wiederum I-14-Komplexe und I-14. Allerdings enthält hier der Enteiweißungsüberstand des nativen Präparates eine säure-stabile Substanz, die in der Position des I-30, in der Präalbumin-gegend also, präzipitiert ist.

Da die Incubation des physiologischen I-30 mit einem Überschuß an Trypsin bekanntlich ebenso zur Entstehung von I-14 führt, kann III wenigstens zum Teil als I-30 identifiziert werden. Im Gegensatz zum ITI bildet der I-30 ziemlich diffuse Antigen-Antikörper-Komplexe aus, weshalb ihm das oberste verschwommene Präzipitat der zweidimensionalen Immunelektrophorese von III zugeordnet werden kann. Die beiden weiteren Präzipitate der Elektrophorese stammen wohl von einer säurelabilen Substanz mit ITI-Antigen-Eigenschaften und noch von ITI selbst her, wobei das zugehörige Flachgel letztere Behauptung bekräftigt.

Incubate mit Trypsinüberschuß und mit durch Eierinhibitor abgeblocktem Trypsinüberschuß zeigt die eindimensionale Elektrophorese von II2 (Abb. 17). Bei der Überschußbehandlung erkennt man I-14-Komplexe, beim Überschuß könnte es sich um I-30-Komplexe handeln, zieht man den nebenstehenden I-30 Vergleich zu Rate. Ebenso scheint bei zweitem ein I-14-Präzipitat vorhanden zu sein.

Leider fehlt infolge Materialmangels der klärende säurestabile Enteiweißungsüberstand. Das Rätsel um die starke Bande in ITI-Position aus der Polyacrylamidelektrophorese bleibt daher ungeklärt.

Abbildung 18 bietet eine Zusammenfassung aller Ergebnisse.

Abbildung 19 zeigt eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit den entscheidenden Präparaten des gesamten Versuches.

Aufgabe: 250 ml Serum

IONENAUSTAUSCH-
CHROMATOGRAPHIE:

DEAE-Zellulose SH 23

0,05 M TRA-Puffer pH 8,6

linearer Gradient: 0,0 - 0,25 M NaCl

Beispiel:

625	416	208	0
0	208	416	625

TESTUNG:

1. Elektroimmundiffusion nach Laurell mit ITI-AS
2. Polyacrylamid-Gel-elektrophorese

Eluat

ITI-Rohmaterial

Präparat II

(NH₄)₂SO₄-FÄLLUNG:
(2,15 M)

GELFILTRATION:

Biogel A-5m

0,05 M Na-Acetat pH 6

TESTUNG: s.o.

A-5ml

A-5ml II

I1	I2	II1	II2
⊕	⊕	⊕	⊕
ITI	ITI + säurelab. Derivat?	I-30 + ITI + säurelab. Derivat	I-14 freiset zbar! nach Herkunft wohl kein ITI mehr! → I-14?

CHARAKTERISIERUNG:

Trypsinhemmttest:

Eindimensionale Immun-
elektrophorese vom:

- a) Nativpräparat
- b) Trypsinüberschuß
+ Ovomucoid und: " + Enteiweißung
- c) säurestabilen
Überstand

Abb. 18: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs und der Ergebnisse

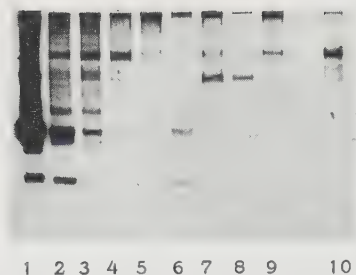


Abb. 19:
Polyacrylamid-Gelelektrophorese
der entscheidenden Präparate
des Versuches

- | | | |
|-----|---------------------------------|------------|
| 1. | Serum | 10 μ l |
| 2. | DEAE-Konzentrat, Fr. 52 - 74, | 3 μ l |
| 3. | DEAE-Sediment, Fr. 52 - 74, | 2 μ l |
| 4. | A-5ml, Fr. 32 - 40 = <u>II</u> | 2 μ l |
| 5. | A-5ml, Fr. 42 - 50 = <u>II</u> | 5 μ l |
| 6. | DEAE-Konzentrat, Fr. 75 - 97 | 3 μ l |
| 7. | DEAE-Sediment, Fr. 75 - 97 | 2 μ l |
| 8. | A-5ml, Fr. 42 - 57 = <u>III</u> | 3 μ l |
| 9. | A-5ml, Fr. 60 - 69 = <u>III</u> | 5 μ l |
| 10. | ITI-Vergleich (2,2 %, Behring) | 20 μ l |

Das ITI Präparat II enthält im Gegensatz zum ITI-Rohmaterial (DEAE-Sediment 52 - 74) nur mehr ganz geringe Verunreinigungen anderer Serumproteine.

Bei III fällt die intensive anodischere Bande auf, die sich nach Ansäuern zumindest zum Teil als I-30 erweist, während III2 die unerklärliche Bande in ITI-Position ausbildet.

Anhang:

Ergänzend sei noch auf ein interessantes Ergebnis eines ähnlichen Versuches hingewiesen.

In diesem speziellen Falle wurde das gesamte gegen ITI-Antiserum präzipitierende Eluat der Ionenaustauschchromatographie nach $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung zur Gelfiltration auf eine Sephadex G200 Säule aufgetragen. Dieses Molekülsieb verfügt erfahrungsgemäß über eine bessere Trennwirkung als das oben verwendete Biogel A-5m. Sephadex G200 separiert Moleküle in der Größenordnung zwischen 1000 - 200.000 MG.

Das Filtrationsergebnis des Versuches gibt Abb. 21 wieder. Man erkennt hier dem ITI-Peak vorgelagerte schwache Präzipitate mit "Rauchwolkenbildung". Diese präzipitatbildenden Fraktionen entsprechen im Elutionsdiagramm genau einem vor dem ITI-registrierten Peak (Abb. 20). Demgemäß muß die Substanz auch höhermolekular als der säurelabile Inhibitor sein.

Zu ihrer Charakterisierung wird ein Azocaseintest durchgeführt. Dazu wird 1 ml der betreffenden G200-Fractionen mit 1ml 2%igem Azocasein (Serva Feinbiochemica Heidelberg) in TRA-Puffer pH 7,8 versetzt. Über Nacht incubiert man die Lösungen bei 37 Grad Celsius, anschließend werden sie mit 0,5 ml 10%iger Trichlor-essigsäure denaturiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand bei E_{366} getestet.

Die untersuchten Fraktionen beinhalten demzufolge antiproteolytische Aktivität. Die gegen ITI-Antiserum präzipitierende Substanz ist somit ein sehr hochmolekularer Hemmstoff. Möglicherweise besteht sie aus einem ITI-Proteinase-Komplex, was weiterer Abklärung bedarf!

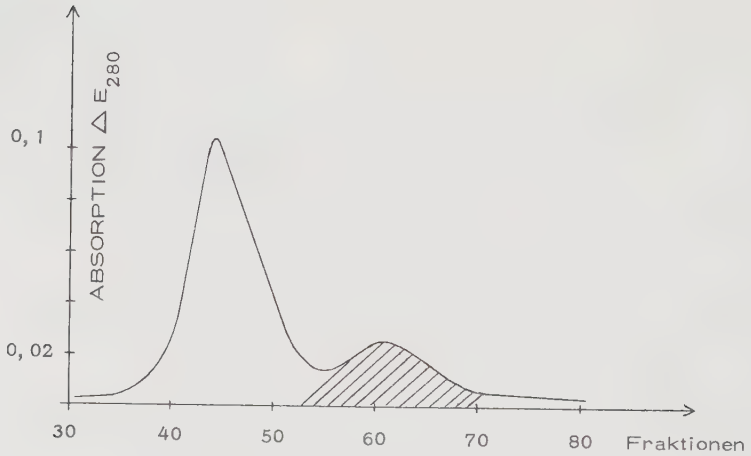


Abb. 20: Gelfiltration von ITI-Rohmaterial auf einer Sephadex G200 Säule:

Säule: 19 x 1950 mm, Fr. à 6 ml, 2 Fr./h

Puffer: 0,05 M TRA-Puffer pH 8,6

///// = ITI-Peak

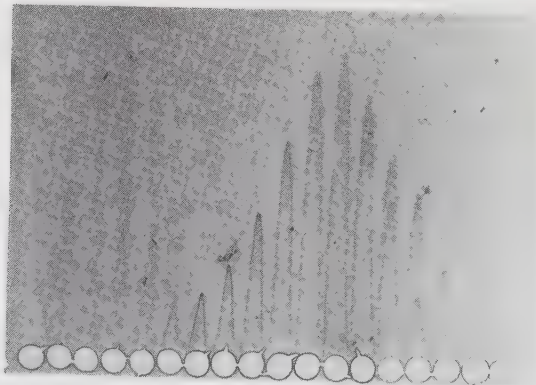


Abb. 21: Elektroimmundiffusion nach Laurell gegen ITI-Antiserum:

Filtrat von ITI-Rohmaterial auf einem Sephadex G200 Molekülsieb

Fr. 38 - 74 (jd. 2.)

IV. EXPERIMENTELLER TEIL

A) Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Zellulose zur Isolierung von ITI-Rohmaterial aus nativem Serum

1. Allgemeines zur Ionenaustauschchromatographie

1.1. Methodik (73)

Ionenaustauscher bestehen aus einem unlöslichen Gerüst (der Matrix), an das geladene Gruppen (Ionen) chemisch gebunden sind, sowie aus frei beweglichen Gegenionen, die die Ladung der gebundenen Ionen kompensieren und gegen andere gleicher Ladung austauschbar sind.

Entscheidend für die Eigenschaften des Austauschers sind Art und Anzahl der geladenen Ionengruppen. Hierbei legt die Art der funktionellen Gruppen Typ und Stärke des Ionenaustauschers fest, während die Gesamtzahl der Gruppen und ihre Zugänglichkeit die Austauscherkapazität bestimmen.

Bei Arbeiten mit Ionenaustauschern sind möglichst gegenionische Puffer einzusetzen, da sich sonst der Puffer am Austausch beteiligt, was zu lokalen Störungen im pH-Gleichgewicht führt. Der pH-Wert ist außerdem so einzustellen, daß die Dissoziation der Funktionsgruppen und daher die Anzahl der zur Austauschreaktion befähigten Gruppen möglichst vollständig ist.

Bei einem Austauschprozess ist die reversible Adsorption aufgrund von Ionenbeziehungen als Trennprinzip wirksam. Zuerst werden die mit der Probe zugegebenen Substanzen an den Austauscher gebunden, dann werden sie dadurch getrennt, daß die Komponenten dank ihrer unterschiedlichen Affinitäten zum Austauscher einzeln nacheinander abgelöst werden. Zum fraktionierten Ablösen genügt es, die Salzkonzentration oder den pH-Wert des Trennmediums zu wechseln.

Im ersteren Fall ist die Konkurrenz um die Ionengruppen des Austauschers bei niedriger Ionenstärke am geringsten. Unter dieser Bedingung werden die Substanzen also am festesten gebunden. Beim Erhöhen der Ionenstärke mittels eines schrittweisen oder kontinuierlichen Gradienten wirken die Pufferionen stärker kompetitiv und vermindern so die Wechselwirkungen zwischen den Komponenten der Probe und dem Ionenaustauscher, was zu ihrer Elution führt,

Kontinuierliche Ionenstärkegradienten lassen sich durch Mischen zweier Puffer verschiedener Ionenstärke erzeugen, die sich in zwei formgleichen kommunizierenden Gefäßen befinden. Werden dabei die Volumenverhältnisse linear geändert, dann ändert sich auch die Ionenstärke linear.

Die erzielbare Trennschärfe beim kontinuierlichen Ionenstärkegradienten hängt ab von der Steilheit des Gradienten und der Durchflußgeschwindigkeit. Die Steilheit eines Gradienten ist bedingt durch die Konzentrationsänderung der Elutionsflüssigkeit, bezogen auf 1 cm^2 Säulenfläche und eine bestimmte Zeiteinheit. Je steiler der Gradient ist, desto dichter folgen die einzelnen Komponenten aufeinander und desto geringer ist die Trennschärfe und umgekehrt. Eine bessere Trennschärfe erzielt man auch bei niedriger Durchflußgeschwindigkeit.

Die Substanzen werden hierbei im Idealfall in symmetrischen Peaks eluiert. Die Höhe der Gipfel gibt jeweils die maximale Konzentration einer Substanz im Gipfel an – meist der Einfachheit halber als Extinktion angegeben.

Zur unspezifischen Bestimmung der Proteine ist die Messung der Absorbanz im UV-Bereich bei 280 nm angezeigt. Das Elutionsprofil stellt die Summe der Absorbanzen einer großen Anzahl von Eiweißstoffen bzw. anderer Substanzen dar, die zwar im wesentlichen

voneinander getrennt, jedoch in Gesamtfractionen zusammengefaßt sind, in welchen sie durch spezifische Methoden weiter identifiziert werden müssen.

1.2. Proteine bei der Ionenaustauschchromatographie (73)

Proteine sind amphotere Polyelektrolyte, die sowohl positive als auch negative Ionen im Molekül enthalten. Hier hängt die Netto-ladung vom pH-Wert der Lösung ab. Beim sogenannten isoelektrischen Punkt ist die Summe der positiven Ladungen ebenso groß wie die der negativen, so daß das Proteinmolekül nach außen als ungeladen erscheint. Im Bereich niedriger pH-Werte ist die Ladung positiv, bei hohen pH-Werten negativ. Deshalb lassen sich Proteine im allgemeinen sowohl an Anionen - wie auch an Kationen-austauscher binden.

Für die Chromatographie der Eiweißstoffe eignen sich nach der Broenstedtschen Theorie jedoch Anionenaustauscher besser, da am gelösten Eiweißstoff bei neutralem pH mehr Arten saurer Gruppen anwesend sind als basischer. Die sauren Gruppen verlieren in mäßig alkalischer Lösung ein Proton, wobei aus dem elektro-neutralen Amphoion ein Anion wird. Die größere Anzahl der sauren Gruppen ermöglicht so eine größere Vielfalt von Sorptions-affinitäten an Anionenaustauscher.

Eiweißstoffe werden in der Regel bei Temperaturen wenig oberhalb 0 Grad Celsius chromatographiert, um einerseits die physikalisch-chemischen und biochemischen Prozesse in der Probe zum Stillstand zu bringen und andererseits die Sorption durch niedrige Temperaturen zu unterstützen.

In der Nähe von 4 Grad Celsius ist außerdem die Gefahr von Konvektionsflüssen in Anbetracht der hier geringen Änderung der Dichte wässriger Lösungen minimal, die Säule ist dadurch thermisch stabilisiert.

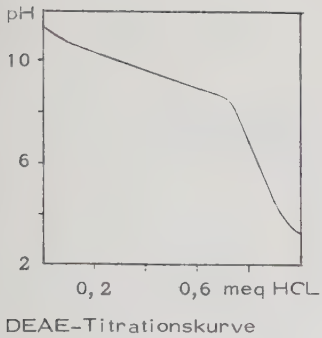
1.3. Zellulose-Ionenaustauscher (73)

Bereits die native Zellulose besitzt infolge einer gewissen Zahl von Carboxylgruppen Ionenaustauschereigenschaften. Diese Carboxylgruppen können durch Oxydation in größerem Ausmaß geschaffen werden, was allerdings eine allzu große Wasserlöslichkeit mit sich bringt. Deshalb werden andere, bei den einzelnen Typen angegebene Gruppen eingeführt. Diese austauschaktiven Gruppen werden an die Hydroxylseitenketten des Zellulosemoleküls gebunden, welche sich am C-Atom 2, 3 und 6 befinden. Die Matrix der Zellulose ist im Gegensatz zu den Kunstharaustauschern hydrophil und besitzt wegen ihrer Fasereigenschaften eine große Oberfläche mit vielen austauschaktiven Gruppen, an denen auch große Moleküle angreifen können. Naturgemäß sind Zelluloseionenaustauscher stark säureempfindlich. Auf den großen Nutzen dieses Austauschertyps für die Proteinforschung haben Peterson und Sober (67) hingewiesen.

2. Vorbereitung zur Chromatographie

2.1. Vorbehandlung des Ionenaustauschers

Zur Chromatographie wird DEAE-Zellulose Servacel SH 23 verwendet, ein Anionenaustauscher mit Diäthylaminoäthylionen als funktionelle Gruppen, der sich besonders bei neutralen und sauren Eiweißstoffen bewährt hat.



Das Zellulosepräparat wird vor der Verwendung auf einem Büchnerfilter nacheinander mit verdünnter HCL und Alkali behandelt, anschließend gründlich mit destilliertem Wasser nachgewaschen und dann mit dem Startpuffer gequollen.

Als Startpuffer dient ein 0,05 M TRAPuffer, der auf einen pH-Wert von 8,6 eingestellt wird und zur Konservierung 0,02 % Na-Azid enthält.

2.2. Packen der Säule

Die gequollene DEAE wird mit Startpuffer zu einer leicht gießbaren Suspension verdünnt. Letztere darf nicht so dick sein, daß beim Gießen eventuell eingeschlossene Luftblasen nicht mehr aufsteigen können. Andererseits bilden sich in zu sehr verdünnten Suspensionen Konvektionsströme, die ein homogenes Packen erschweren.

Die 30 x 360 mm große Säule wird genau senkrecht eingespannt und zur Hälfte mit Startpuffer aufgefüllt, der Säulenauslauf geschlossen. Dann wird die Austauschersuspension längs eines Glasstabes oder an der Rohrwand entlang vorsichtig in das Trennrohr gegossen. Man wartet, bis ein Teil sedimentiert ist, dann öffnet man den Säulenauslauf. Mit Hilfe aufgesetzter Eluant-Reservoirs ist es möglich, die gesamte Austauschersuspension in einem Zug zuzugießen. Ein Pufferreservoir am Säulenkopf sorgt dafür, daß die Säule beim freien Sedimentieren nicht trocken läuft.

2.3. Äquilibrieren

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, muß sich der Ionenaustauscher vor Beginn des Trennexperimentes im Gleichgewichtszustand mit dem Startpuffer befinden. Daher wird die Säulenfüllung nach dem Packen über Nacht mit mindestens zwei Bettvolumen an Puffer vorgespült. Der Puffer wird bereits hier mit 10^{-4} M Benzamidin versetzt, einer antiproteolytischen Substanz, die auf den ITI, wie später gezeigt, stabilisierend wirkt.

Das System ist ausreichend äquilibriert, wenn der pH-Wert des die Säule verlassenden Mediums Übereinstimmung mit dem eingesetzten Startpuffer zeigt.

3. Durchführung der Chromatographie

3.1. Ausgangsmaterial zur Gewinnung von ITI

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung und Reindarstellung von ITI dient von verschiedenen Patienten der Rheumatikerabteilung der Universitätspoliklinik München zusammengewürfeltes Serum. Bis zu seiner Verwendung wurde es in eingefrorenem Zustand aufbewahrt.

3.2. Aufbringen der Probe

250 ml kurz zuvor aufgetautes Serum und 250 ml eines mit 10^{-4} M Benzamidin versetzten 0,05 M TRA-Puffers pH 8,6 werden gemischt und genau auf den pH-Wert von 8,6 eingestellt. Nun wird der Überstand an Startpuffer von der Oberfläche der Austauscherfüllung durch Abpipettieren oder Einziehenlassen entfernt, ein Teil des

Materials bei geschlossenem Säulenauslauf mit der Pipette vorsichtig auf die Geloberfläche aufgegeben und der Rest in einem Glaskolben nahtlos hinzugefügt. Man öffnet den Auslauf wieder und läßt das Serum-Puffer-Gemisch unter dem Einfluß seiner Schwerkraft in die Säule einsickern. Sobald alles eingezogen ist, überschichtet man das Gel mit Puffer, um eine regelmäßige Verteilung der Elutionslösung in der gesamten Säule zu gewährleisten.

3.3. Elution

Das auf der Säule befindliche Serum wird jetzt mit dem Standardpuffer ohne Verwendung einer Pumpe ausgewaschen und in vier Gefäßen zu etwa gleichen Volumenverhältnissen gesammelt. Die weitere Elution erfolgt über eine Serva-Pumpe, die konstanten Durchfluß gewährleistet und mit einem zeitgesteuerten Fraktions-sammler, der gleiche Volumina abmißt. Bei einer Extinktion von 253 nm wird der ganze Vorgang mit einem Uvicord-Schreiber verfolgt (Abb. 4).

Zuerst läßt man noch den Startpuffer pH 8,6 durch die Säule laufen, dann schließt man den Zulauf an einen Gradientenmischer an. Eluiert wird mit einem aus verschiedenen Versuchen empirisch ermittelten, kontinuierlich linear ansteigenden Ionenstärkegradienten. Hierzu befinden sich 1250 ml des Startpuffers und 1250 ml eines Endpuffers in jeweils einem identischen Behälter. Durch ein kommunizierendes Röhrchen am Boden der Gefäße stellt sich das gewünschte Mischungsverhältnis im Sinne des von 0,00 M bis 0,25 M ansteigenden Ionenstärkegradienten ein. Der Unterschied des Endpuffers vom Startpuffer besteht dabei ausschließlich in seinem Na-Gehalt von 0,25 M, ansonsten ist er ebenso ein 0,05 M TRA-Puffer pH 8,6.

Während des gesamten Elutionsvorganges wird auf Kühllhaltung geachtet.

4. Testung des Eluates auf ITI-Gehalt

4.1. Elektroimmundiffusion nach Laurell (60)

Prinzip: Zum spezifischen Nachweis des ITI mit Hilfe der Elektroimmundiffusion nach Laurell verwendet man das monospezifische ITI-Antiserum von Kaninchen. Das Antigen reagiert bei seiner elektrophoretischen Wanderung im Agarosegel (bei pH 8,6 zur Anode) solange mit dem spezifischen gleichmäßig verteilten Antikörper, bis die gesamte aufgebrachte Menge an Antigen verbraucht ist. Es hinterläßt ein langgestrecktes Immunpräzipitat in Form einer Gauss-Kurve, das Ausdruck eines Antigen-Antikörper-Komplexes ist. Voraussetzung für die gute Entwicklung der Präzipitatlinien ist das sich automatisch einstellende optimale Verhältnis zwischen Konzentration des Antigens und Titer des Antikörpers. Die Länge des Präzipitates ist zudem proportional zur Konzentration des Antigens, wenn dieses in einem definierten Volumen eingebracht wird.

Material: Anti-Inter- α -Trypsininhibitor von Kaninchen, Behringwerke, Marburg; Agarose, Behringwerke

Durchführung: Je 12 ml erhitzte 2%ige Agaroselösung in Barbitallpuffer pH 8,6 ($\mu = 0,02$) werden mit 0,25 ml Anti-ITI-Serum versehen und auf 10 x 10 cm große, abgeflamte und absolut waagrecht liegende Glasplatten aufgetragen. Die Zumischung des Antiserums erfolgt bei ca. 56 Grad Celsius, da es bei höheren Temperaturen denaturiert. In die erstarrte Agarosegelschicht stantzt man auf einer Seite eine Reihe von Auftragstellen, in welche je

8 µl der zu prüfenden Fraktionen eingefüllt werden. Die beschickten Platten werden in der Elektrophoresekammer durch Filterpapier mit dem 0,0375 M Barbitalpuffer pH 8,6 verbunden, über Nacht bei Feldstärken von 2 - 4 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend getrocknet und mit Coomassie G 250 gefärbt (Abbildung 3 + 5).

4.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (26)

Prinzip: Polyacrylamidgele sind das dreidimensionale Polymerisations- und Vernetzungsprodukt von Acrylsäureamid mit einem Vernetzer. Sie zeichnen sich durch hohe Viskositäten und damit hohe Reibungswiderstände aus. Teilchen, die darin wandern, erfahren je nach ihrer Dimension einen verschiedenen Reibungswiderstand. Sie lassen sich daher nicht nur nach ihrer Ladung auftrennen, sondern auch nach ihrer Molekülgröße und Molekülgestalt "aussieben". Die Trennwirkung des Polyacrylamidgels beruht also auf der Kombination zweier Prinzipien - der elektrophoretischen Beweglichkeit und des Molekularsiebeffektes, der im wesentlichen von der Gelporengröße bestimmt wird. So kommt es vor, daß Proteine trotz größerer elektrophoretischer Beweglichkeit im Gel langsamer wandern als Proteine geringerer Beweglichkeit, weil sie im Gelgitterwerk aufgrund ihrer Dimensionen stärker abgebremst werden.

Material und Durchführung: Die benützte Flachgelapparatur, auf die bis zu 24 Proben aufgetragen werden können, stammt von der Firma EC Apparatus Corporation.

Zur Verwendung kommt ein 7,5%iges Mittelporengel pH 8,9, das Proteine vom MG 10^4 bis 10^6 aussiebt.

Nr.	Bestandteile/100 ml Lsg.	pH	Mischungs- verhältnis	Elektroden- puffer/ 1000 ml	pH
1	1 N HCl 48,0 ml Tris 36,6 g Temed 0,23 ml	8,9	1 Teil Nr.1 2 " Nr.2 1 " H ₂ O	Tris 6,0 g Glyzin 28,8 g	8,3
2	Acrylamid 30,0 g Bis 0,8 g		4 " Nr.3	10% wässrige Lösung	
3	Persulfat 0,14 g				

Persulfat = Ammoniumperoxodisulfat	}	=	Katalysator-
Temed = N, N, N', N', Tetramethyläthylendiamin			Redoxsystem
Bis = N, N', Methylenebisacrylamid			Vernetzer

Je 25 µl der DEAE-Gradienten-Fraktionen 34 - 97 (jede dritte Fraktion) + je 5 µl Saccharose / Bromphenolblau zur Markierung werden in die Schlitztaschen des erstarrten Flachgels geschichtet.

Während der elektrophoretischen Auftrennung laufen die zu trennenden Substanzen von oben nach unten, wozu die Kammer oben $\ominus$ und unten $\oplus$ gepolt wird. Die ersten 30 min wird die Elektrophorese bei 150 Volt durchgeführt, was eine Zonenschärfung während der Einwanderung der Substanzen in das Gel bewirkt. Der weitere Lauf erfolgt bei einer Endspannung von 300 Volt und ist nach ca. 3 Std. beendet (Abb. 6).

B) Ammoniumsulfatfällung als Anreicherungs- und weiteren Reinigungsprozess des ITI-Rohmaterials

1. Allgemeines (61)

1.1. Löslichkeitseigenschaften von Proteinen

Die vielen positiv oder negativ geladenen Gruppen der Aminosäureseitenketten eines Proteins bewirken, daß die Moleküle untereinander, mit kleinen Ionen entgegengesetzter Ladung und mit Wasser "Reaktionen" eingehen können. Ist die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Molekülen groß, die "Reaktion" des Proteins mit H_2O dagegen gering, so verhält sich das Protein unlöslich. Entgegengesetzte Voraussetzungen begünstigen die Löslichkeit eines Proteins.

Jede Bedingung, die Protein-Protein-Wechselwirkungen fördert und Protein-Wasser-Wechselwirkungen herabsetzt, mindert somit die Löslichkeit des Proteins und umgekehrt. Im allgemeinen ist die Löslichkeit der meisten Proteine eine Funktion von Ionenstärke, pH und der Konzentration organischer Lösungsmittel.

1.2. Aussalzung von Proteinen

Das Phänomen der Aussalzung beobachtet man bei höheren Ionenstärken. Wahrscheinlich konkurrieren das Protein und die Salzionen um die vorhandenen Wassermoleküle, um sich aufzulösen. Bei ausreichend hohen Salzkonzentrationen nimmt die effektive Aktivität des Wassers ab, d.h. es sind zu wenig Wassermoleküle für eine vollständige Lösung des Proteins vorhanden. Dominiierend ist die Wechselwirkung der Proteinmoleküle untereinander, und es erfolgt deren Ausfällung.

In diesem Bereich hoher Salzkonzentrationen steht die Löslichkeit des Proteins oft in logarithmischer Beziehung zur Ionenstärke nach folgender Gleichung:

$$\log S = \beta' - K'_s \mu$$

S steht für die Löslichkeit in Gramm/Liter,

β' ist der Logarithmus der hypothetischen Löslichkeit bei einer Ionenstärke von Null,

K'_s die Aussalzkonstante und

μ die Ionenstärke.

Eine geringe Änderung der Salzkonzentration bewirkt dementsprechend eine große Abnahme der Proteinlöslichkeit, was dieses Verfahren zu einem sehr nützlichen Reinigungsschritt für Proteine macht.

Man verwendet allgemein Ammoniumsulfat zur Proteinaussalzung, da es außerordentlich gute Löslichkeitseigenschaften besitzt, die von Temperaturveränderungen nicht beeinträchtigt werden.

2. Aufbereitung des Eluates

Die getesteten, ITI enthaltenden Fraktionen 52 bis 74 (Abb. 4, 5, 6) der Ionenaustauschchromatographie werden vereinigt und mit Stickstoffüberdruck unter Kühllhaltung auf ein Volumen von 100 ml konzentriert (in einer Amicon-Zelle mit PM 10 Membran).

Da der ITI nach Heimbürger (31) mit Ammoniumsulfat präzipitierbar ist, wird das Konzentrat mit 2,15 M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ gefällt. Die Zugabe des Ammoniumsulfates erfolgt unter ständigem Rühren und unter Einkühlung innerhalb eines Zeitraumes von 30 Minuten. Die Lösung ruht eine weitere halbe Stunde und wird dann 15 min lang bei 18.000 Umdrehungen in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wird in 10 ml 0,05 M Na-Acetatpuffer pH 6,0 aufgenommen.

Ebenso verfährt man mit den modifizierten ITI-Fraktionen 75 bis 97 (Abb. 4, 5, 6).

Q Gelfiltration auf Biogel A-5m zur Reindarstellung von homogenem ITI und von "ITI-Derivaten".

1. Allgemeines zur Gelfiltration

Die Gelfiltration ist ein chromatographisches Verfahren, das die Trennung von Molekülen aufgrund unterschiedlicher Molekülgrößen erlaubt. Partikel, die größer sind als die größten Poren des gequollenen Gels, können die Gelkörner nicht durchdringen und wandern an diesen vorbei. Sie verlassen die Säule zuerst. Kleinere Moleküle hingegen durchlaufen einen mehr oder weniger großen Teil der Gelkörner. Je kleiner sie sind, um so mehr Poren sind für die zugänglich. Sie erscheinen daher im Eluat in der Reihenfolge abnehmender Molekülgrößen.

2. Vorbereitung zur Gelfiltration

2.1. Wahl des Puffers zur Gelfiltration

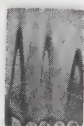
Da die bisherigen Arbeiten zur Isolierung des ITI bereits mehrere Tage in Anspruch genommen hatten, schien es angebracht, den ITI auf seine pH-Stabilität hin zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wird 0,05 M Tris-Lösung auf die pH-Werte 6, 7, 8 und 9 eingestellt. Ein 2,2%iges ITI-Präparat der Behringwerke, Marburg, dient als Testmaterial nach folgendem Ansatz:

$$\begin{array}{rcl} 5 \mu\text{l ITI (2,2 \%)} & = & 110 \mu\text{g ITI} \\ + 105 \mu\text{l jeweiliger Puffer} & & \\ \hline = 110 \mu\text{l} & \hat{=} & 110 \mu\text{g} \end{array}$$

Nach denselben Angaben stellt man einen Vergleich mit physiologischer Kochsalzlösung her.

Jeweils 2 μ l dieser Proben werden im Abstand von 0, 24, 48 und 72 Stunden Elektroimmundiffusionen nach Laurell unterzogen, zwischendurch stehen die Lösungen bei Raumtemperatur. Bereits nach 48 Stunden zeigen die zuvor gleichgestalteten Präzipitate bei den pH-Werten 7 und 9 ein Auflösen der ursprünglichen Kon-
turen. Es sind mehrere schwache Peaks entstanden. Nach 72 Stunden ist nur bei pH 6 das anfängliche Bild erhalten. Wiederholte Versuche bestätigen das Ergebnis und rechtfertigen den Einsatz von pH 6 für den weiteren Reinigungsprozeß.



pH: 6, 7, 8, 9 NaCl
nach 72 Stunden

2.2. Anhang: Inhibitoren-Inkubate

TrasyloI, Sojabohnentrypsininhibitor, Benzamidin und EDTA, alle antiproteolytisch wirksame Substanzen, werden auf ihre Schutzfunktion gegenüber ITI überprüft.

Herstellung der Lösungen:

TrasyloI: 5 ml/1000 ml $\approx$ 500 ImU/1000 ml

- a) 0,5 ImU = 5 μ l + 500 μ l 0,05 M Tris-Puffer pH 8
+ 500 μ l 0,9 % NaCl
- b) 50 ImU = 500 μ l + 500 μ l Puffer

SBTI (= Sojabohnentrypsininhibitor):

5 mg in 56,7 ml 0,9 % NaCl

a) 0,5 ImU = 5 μ l + 500 μ l Puffer + 500 μ l 0,9 % NaCl

b) 50 ImU = 500 μ l + 500 μ l Puffer

Benzamidin:

MW=183 183 mg in 500 ml 0,9 % NaCl = 2×10^{-3} M

a) 10^{-5} M = 5 μ l + 500 μ l Puffer + 500 μ l 0,9 % NaCl

b) 10^{-3} M = 500 μ l + 500 μ l Puffer

EDTA:

MW=292 292 mg in 500 ml NaCl = 2×10^{-3} M

a) 10^{-5} M = 5 μ l + 500 μ l Puffer + 500 μ l 0,9 % NaCl

b) 10^{-3} M = 500 μ l + 500 μ l Puffer

Incubationsansatz:

105 μ l jeder Lösung

+ 5 μ l ITI-Präparat (2,2%ig, Behringwerke)

110 μ l $\approx$ 110 μ g ITI

Die Proben, die bei Raumtemperatur stehen, werden mehrmals im Abstand von 24 Stunden elektrophoretisch untersucht. Die Präzipitate sind für alle Substanzen wie für jeweils beide Konzentrationen identisch und weisen auch nach Tagen keine Veränderungen auf, was aus entsprechenden Angaben von Steinbuch zu erwarten ist (83).

Zum Schutze des ITI gegen antiproteolytisch wirkende Substanzen wird daher bei allen Isolationsschritten den jeweiligen Puffern 10^{-4} M Benzamidin zugesetzt.

3. Durchführung der Gelfiltration

Als Molekülsieb dient ein Biogel A-5m-Agarosebett. Das Gel zeichnet sich durch höchste chemische Reinheit, die ein Minimum an nicht-spezifischer Bindung sichert, und hohe Flußrate aus. Es erträgt einen pH-Bereich von 4 bis 9 und fraktioniert Moleküle in der Größenordnung von 10^4 bis 10^7 .

Die 26 x 1750 mm große Säule wird nach dem beschriebenen Verfahren hergestellt, mit 0,05 M Natriumacetatpuffer pH 6, der 10^{-4} M Benzamidin enthält, äquilibriert und an Pumpe, Fraktionssammler und Registriergerät (Isco Modell UA 5 Absorbance Monitor, 280 nm) angeschlossen. Ein Eichlauf von 50 mg Serumalbumin beweist anhand der Symmetrie der registrierten Peaks ihre volle Funktionsfähigkeit.

Das vorbereitete ITI-Rohpräparat der DEAE-Fraktionen 52 bis 74 wird nun aufgegeben und nach abnehmendem MG getrennt (Abbildung 8 = A - 5ml).

Abbildung 9 zeigt die Gelfiltrationskurve des Präparates der DEAE-Fraktionen 75 bis 97 (= A - 5m II).

D) Charakterisierung des ITI und seiner "Derivate"

Elektroimmundiffusionen nach Laurell und Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (Abb. 10, 11, 12, 13) veranlassen eine Vereinigung der Fraktionen 32 bis 40 und 42 bis 50 von A-5m I und der Fraktionen 42 bis 57 und 60 bis 69 von A-5m II. Die so erhaltenen vier Präparate werden mit einer Ultrafiltrationszelle auf je ca. 20 ml konzentriert.

1. Zweidimensionale Immunelektrophorese (9/59)

Material: Siehe Elektroimmundiffusion nach Laurell.

Durchführung: Die erste Dimension besteht in der elektro-phoretischen Auftrennung der Substanz.

Auf eine 7 x 7 cm große Glasplatte wird das Gemisch aus 3 ml 2%iger erhitzter Agaroselösung und 3 ml Na-Barbitalpuffer pH 8,6 ($\mu = 0,02$) gegossen. Mittels einer Stanzkanüle hebt man an einer Seite der Platte zwei Auftragstellen aus. Eine Auftragsstelle wird mit 8 μ l der zu analysierenden Substanz gefüllt, die andere mit der mit Bromphenolblau markierten Probe (bzw. meist mit Serumalbumin) beschickt, um eine Sichtkontrolle der Wanderungsstrecke zu ermöglichen. An die Elektrophorese werden dann für 60 bis 80 Minuten unter Wasserkühlung 300 Volt Ausgangsspannung, d.h. eine Feldstärke von 8 - 10 Volt/cm angelegt.

Sofort nach Beendigung der ersten Elektrophoresestufe entfernt man den Agarosefilm ausschließlich des Gelstreifens, der die aufgetrennte Probe beinhaltet. An diesen wird 5 ml vorbereitete Agaroselösung in Barbitalpuffer pH 8,6 ($\mu = 0,02$) angegossen. Letztere enthält 125 μ l ITI-Antiserum.

Der zweite längere Elektrophoreseschritt wird über Nacht bei einer Spannung von 150 Volt im rechten Winkel zur ersten Elektrophoreserichtung durchgeführt. Es erfolgt die Ausbildung eines Immunpräzipitates (Abb. 15).

2. Fibrinagarelektrophoresen (33)

Material: ITI-Antiserum vom Kaninchen, Behringwerke; Agarose, Behringwerke; Trypsin vom Rind, behandelt mit TPCK; Fibrinogen vom Rind, Behringwerke.

Durchführung: 9 Teile einer 1,5%igen Agaroselösung in Na-Barbituratpuffer pH 8,2 (Ionenstärke 0,05) und ein Teil einer 0,1 N $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Lösung werden auf 50°C erhitzt und mit einer 0,4%igen Lösung aus Fibrinogen und Na-Barbituratpuffer vermischt. 6 ml dieser Aufbereitung werden auf eine 7 x 7 cm große Glasplatte gegeben. Ist das Gel gefestigt, werden die Platten in einer feuchten Kammer auf 80°C erhitzt und dort 30 min belassen. Anschließend werden fünf Kanäle in gleichem Abstand und parallel zur Elektrophoreserichtung ausgestanzt. Zwischen den Kanälen wird eine Auftragstelle angebracht; dahinein kommt die Substanz. Nach der Elektrophorese füllt man die Kanäle entsprechend der Abb. 14 entweder mit ITI-Antiserum oder mit Trypsinlösung (0,01 %), und verwahrt die Platten während des nun erfolgenden Diffusionsvorganges für ca. 12 Stunden in einer feuchten Kammer. Überschüssiges Trypsin, Antiserum und Hydrolyseprodukte werden anschließend herausgewaschen, die Fibrinagarplatten werden getrocknet und in der üblichen Weise gefärbt (Abb. 14).

3. Trypsinhemmtest (20)

Prinzip: Das proteolytische Pankreasenzym Trypsin setzt aus dem Substrat N^a -Benzoyl-L-Arginin-4-Nitroanilid (= BAPNA) den Farbstoff p-Nitroanilid frei. Ein Trypsinmilliunit ist dabei diejenige Trypsinmenge, die 1 μMol BAPNA pro Minute bei 25°C hydrolysiert. Spektrophotometrisch bewirkt diese Spaltungsreaktion unter Standardbedingungen (im 3 ml-Ansatz; 10 mU Trypsin/0,2 ml) eine Extinktionszunahme von $E_{405} = 0,0066/\text{min}$. Die Verminderung der Extinktionszunahme um den gleichen Betrag bei Inhibitorzusatz in Trypsinstandardansätzen zeigt ein Inhibitormilliunit (ImU) an.

Material: Trypsin vom Rind, behandelt mit TPCK; BAPNA, Merck/Darmstadt.

Durchführung: Zur Hemmwertbestimmung pipettiert man in eine 3 ml-Küvette:

0,200 ml Trypsinlösung (hier: 10 mU/0,2 ml
0,0025N HCl)
1,8-x ml 0,2 M TRA-Puffer pH 7,8
x ml Probesubstanz
1,000 ml BAPNA als Substrat

Die Probenmengen müssen dabei so gewählt werden, daß die eventuelle Hemmung möglichst etwas unter 50 % liegt, da die Hemmkurve bei mehr als 50 % Hemmung nicht mehr linear verläuft.

Man liest am Photometer bei einer konstanten Temperatur von 25°C die Extinktionsänderung über einen Zeitraum von 3 Minuten ab und bildet aus vier gewonnenen Werten das arithmetische Mittel. Die ΔE_{405} eines Ansatzes ohne Probenzugabe bildet den Vergleichswert.

Aus der Extinktionsminderung von Vergleichswert und Hemmwert läßt sich der Inhibitorgehalt der eingesetzten Probe folgendermaßen berechnen, wenn ΔE_{405} der ungehemmten Reaktion im Ansatz 0,066/min ist:

$$\frac{(\Delta E/\text{min})_{\text{Trypsin}} - (\Delta E/\text{min})_{\text{Inhibitor}}}{0,066} \quad (\text{ImU})$$

Durch Multiplikation mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor erhält man die Inhibitorkonzentration der untersuchten Hemmlösung.

4. Inhibitorfreisetzung durch Trypsin

Prinzip: Trypsin im Überschuß setzt sowohl aus dem ITI wie aus dem I-30 den säurestabilen I-14 frei. Die Menge an freigesetztem Inhibitor läßt sich mit dem Standard-Trypsinhemmtest bestimmen.

Durchführung: Zu je einem ml der vier Proben fügt man 1 ml TRA-Puffer pH 7,8, um die pH 6-Präparate in einen pH-Bereich zu bringen, in dem Trypsin zu spalten vermag. Anschließend wird das Pankreasenzym im Überschuß zugesetzt.

Nach einer zweistündigen Incubation bei 37°C werden die 2 ml-Proben durch Hinzufügen von 0,2 ml Perchlorsäure (70 %) enteiweißt. Die Überstände werden mit starker NaOH neutralisiert (auf pH 7,8) und die antitryptische Aktivität wird in der angegebenen Weise bestimmt.

Im Hemmtest wird noch der Puffer, den die nativen Präparate enthalten, untersucht. Dazu wird das Gemisch aus 1 ml Na-Acetatpuffer pH 6 und 1 ml TRA-Puffer pH 7,8 mit 0,2 ml Perchlorsäure gefällt, sein Überstand neutralisiert und getestet. Die tatsächlich vorhandene Pufferhemmung geht in die Berechnungen mit ein.

5. Perchlorsäurefällung der Nativpräparate

Prinzip: Bei der Deproteinisierung mit 70%iger Perchlorsäure werden mit Sicherheit alle säurelabilen Eiweißstoffe entfernt. Es verbleiben nur die säurestabilen Anteile im Überstand.

Durchführung: Zu 1 ml-Proben der vier Präparate und zusätzlich zu 1 ml Na-Acetatpuffer pH 6 gibt man 0,25 ml TRA-Puffer pH 7,8 und je 0,125 ml 70%ige Perchlorsäure. Die Überstände werden

wiedering mit NaOH neutralisiert und dann im Hemmtest überprüft.

6. Eindimensionale Immunelektrophoresen

Eindimensionale Immunelektrophoresen werden von den nativen Materialien, der Inhibitorfreisetzung nach Trypsinbehandlung, den säurestabilen Eiteiweißungsüberständen der Nativpräparate und als Ergänzung von mit Eierinhibitor abgeblockten Trypsinüberschußincubaten angefertigt.

Im letzteren Falle bilden sich I-14-Komplexe; das Ovomuroid, das Trypsin im Verhältnis 1:1 hemmt, verhindert eine weitere Degradation.

Die Elektrophoresen werden in der überall nachzulesenden Weise ausgeführt. Um scharfe Präzipitate zu erhalten bzw. um Substanzen nachweisen zu können, die wie der I-30 nur ab einer bestimmten Konzentration präzipitieren, werden pro Probe ca. 8 ImU aufgetragen (Abb. 16, 17).

Das ITI-Antiserum stammt in diesem Fall von einem im Labor von Professor Hochstraßer immunisierten Kaninchen.

V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Mit den erwähnten Methoden wurde der säurelabile hochmolekulare humorale Inter-Alpha-Trypsininhibitor aus nativem Humanserum gewonnen. Über seine Isolierung wurde bereits insbesondere von Heimbürger (29/34) und Steinbuch (83/84) berichtet, wobei sich beide etwas andersgearteter Verfahren bedienten. Die hier verwendete Trennungsmethode zeigt mehr Anlehnung an die von Heimbürger ermittelte.

Zum Schutze des intakten Moleküls gegenüber im Serum vorhandenen proteolytischen Einflüssen und einer damit verbundenen Modifizierung des Inhibitors diente die Anwesenheit von Benzamidin. Der Beweis dafür wurde durch Incubate von ITI mit verschiedenen antiproteolytisch wirkenden Substanzen, darunter Benzamidin, erbracht. Es ergab sich auch nach mehreren Tagen Stehen der Lösungen bei Raumtemperatur keine Heterogenität in der zweidimensionalen Immunelektrophorese. Schon Steinbuch berichtete über eine gewisse Schutzwirkung von Trasylol, Suramin, EDTA und Benzamidin gegenüber dem säurelabilen Proinhibitor (83).

Niedere Temperaturen während des gesamten Versuchsablaufes und die Wahl des richtigen Puffers zur Gelfiltration sollten ebenso einer Modifizierung entgegenarbeiten.

Die entscheidende Polyacrylamid-Gelelektrophorese besagte, daß die ITI-Präparation auf diese Weise relativ rein gewonnen wurde. Eine schwache über dem ITI liegende Bande könnte nach entsprechend lautenden Angaben (83) ein Aggregationsprodukt sein (Abb. 19).

Ebenfalls Steinbuch beobachtete eine Degradation beim Reinigen von ITI (83). Nach Gelfiltration von rohem, durch Chromatographie auf DEAE-Zellulose gewonnenem ITI bemerkte sie gewöhnlich zwei

Peaks. Der erste Peak enthielt homogenen ITI, während heterogenes Material mit einigen Banden von stark anodischer Beweglichkeit im zweiten Peak gefunden wurde. Letzteres zeigte nichtsdestoweniger die gleiche immunologische Identität. Steinbuch vermutete daher, daß diese Banden vielleicht ITI-Spaltprodukte seien, hervorgerufen durch irgendwelche proteolytische Aktivitäten.

Auch im Laufe der Experimente dieser Arbeit konnten neben dem homogenen ITI-Präparat (I1) drei weitere heterogene Substanzen mit ITI-AG-Eigenschaften aus dem Serum extrahiert werden (I2, I11, I12). Bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese erfolgte die Ausbildung von zwei bzw. drei Präzipitaten (Abb. 15). Im Trypsinhemmtest zeigten die drei ITI-"Derivate" antiproteolytische Aktivität und bei der Fibrinagarelektrophorese repräsentierten sie aktive Trypsininhibitoren (Abb. 14).

Nach Behandlung mit Trypsinüberschuß und nach Perchlorsäurefällung der nativen Materialien gelang zumindestens zum Teil ihre nähere Charakterisierung (s. Abb. 16).

Eindimensionale Immunelektrophoresen des trypsinincubierten und enteiweißten Präparates I2, die Kenntnis seiner Abstammung aus dem vorderen Teil der DEAE-Elution und die Ausprägung einer ITI-Bande in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese besagten, daß es sich hier sehr wahrscheinlich auch noch um ITI handeln müsse. Die zweidimensionale Elektrophorese von I2 zeigte allerdings ein weiteres Präzipitat und die Ausbildung einer diffusen "Wolke". Urheber dessen könnte ein säurelabiler Stoff sein oder bereits ein geringer Anteil des nachfolgenden Präparates I11 in niedriger Konzentration. Letzteres könnte durch eine nicht exakt erfolgte Zweiteilung des ITI-kreuzreagierenden Eluates im Anschluß an die Ionenaustauschchromatographie zu Beginn des Versuches bewirkt worden sein.

Die in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese anodischer als der ITI liegende bandenbildende Substanz III erwies sich bei der eindimensionalen Immunelektrophorese des säurestabilen Enteiweißungsüberstandes anhand der Position des Präzipitates als der physiologische geringmolekulare I-30.

Daneben enthielt das Präparat wieder den ITI, was dem Flachgel entnommen werden konnte (= unteres Präzipitat bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese), und wohl noch ein säurelabiles Produkt (= mittleres Präzipitat der 2d,-IE).

Dieses Ergebnis dürfte eine Bestätigung der oben aufgeführten Vermutung von Steinbuch über die gleichzeitige Gewinnung von ITI-Spaltprodukten bei der Isolierung des Proinhibitors sein.

Interessant wäre noch die entscheidende Aufklärung des Präparates II2 gewesen, die infolge Materialmangels aber nicht mehr ausgeführt werden konnte. Möglicherweise könnte es sich hierbei nämlich um den unphysiologischen I-14 handeln.

Setzte man die Inhibitorkapazitäten der nativen Materialien, der Lösungen nach I-14-Freisetzung und die Kapazitäten im säurestabilen Enteiweißungsüberstand untereinander in Beziehung, so fiel als erstes bei den ITI-Präparaten I1 und I2 eine Verdoppelung der ursprünglichen ImU/ml nach I-14-Freisetzung auf. Der ITI ist ein verschlungenes Molekül, an das Trypsin nur von außen angreifen kann. Ein Überschuß des Enzyms vermag jedoch das Molekül aufzubeißen. Die damit erfolgte Freilegung einer eventuell verborgenen zweiten Haftstelle für Trypsin könnte das obige Ergebnis erklären.

Unter der Annahme, daß II1 aus I-30, IT1 und einem säurelabilen Stoff besteht, könnten die ImU/ml folgendermaßen zustande kommen: Der I-30 ist auch im säurestabilen Überstand vorhanden, die beiden säurelabilen Substanzen dagegen nicht. Aus IT1 und I-30 wird durch Trypsinüberschußincubation I-14 freigesetzt, beim IT1 wieder verdoppelt, während das säurelabile Produkt nur im Nativpräparat seine Hemmeigenschaften entfaltet.

Eine Erläuterung zu II2 erübrigt sich, da eine sichere Charakterisierung fehlt (Tabelle 2).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Isolierung und Reindarstellung von Inter-Alpha-Trypsin-inhibitor aus nativem Humanserum mittels Ionenaustauschchromatographie, Ammoniumsulfatpräzipitation und Gelfiltration konnten zusätzlich zum säurelabilen hochmolekularen Big-Inhibitor (= I1) drei weitere Präparate (= I2, I11, I12) mit ITI-Antigeneigenschaften gewonnen werden.

Im Trypsinhemmtest erweisen sie sich als hemmaktiv, bei der Fibrinagarelektrophorese repräsentieren sie aktive Trypsininhibitoren. Die Anzahl der Immunpräzipitate gegen monovalentes ITI-Antiserum bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese belegt, daß jedes dieser Produkte zwei bzw. drei kreuzreagierende Anteile enthält.

Eindimensionale Immunelektrophoresen von Trypsinüberschuß-incubaten, die

- a) mit Ovomucoid abgeblockt
- b) enteiweißt wurden

und von den säurestabilen Enteiweißungsüberständen der Nativpräparate besagen, daß I2 auch noch ITI ist, I11 dagegen neben einer kleinen Menge ITI und einem säurelabilen Stoff zur Hauptsache aus dem physiologischen I-30 besteht. Von I12 läßt sich infolge Materialmangels mit Sicherheit nur feststellen, daß es in I-14 Komplexe übergeführt werden kann.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Arnesen H., Fagerhol M.K.:
Scand. J. clin. Lab. Invest. 29, 259-263 (1972)
2. Astrup T., Sterndorf J.:
Scand. J. clin. Lab. Invest. 7, 239 (1955)
3. Barret A.J., Starkey P.M.:
Biochem. J. 133, 709-724 (1973)
4. Bauer K.:
Humangenetik 8, 357 (1970)
5. Becker E.L., Kagen L.:
Ann. N. Y. Acad. Sci. 116, 886 (1964)
6. Bieth J., Aubry M., Travis J.:
Proc. Int. Res. Conf. 2nd, Bayer Symp. V, 53 (1973)
7. Bretzel G., Hochstraßer K.:
Z. phys. Chemie 357, 487-489 (1976)
8. Camus L., Gley E.:
C. R. Soc. Biol. 49, 8 (1897)
9. Clarke M. G., Freeman T.:
Clin. Sci. 35, 403 (1968)
10. Donaldson V. H., Evans P. R.:
Amer. J. Med. 35, 37 (1963)
11. Deiler A.:
Medizinische Dissertation, Lud.-Max.-Uni München
(1978), unveröffentlicht
12. Egeberg O.:
Thrombos. Diathes. haemorrh. 13, 516 (1965)
13. Egeberg O.:
Thrombos. Diathes. haemorrh. 14, 473 (1965)
14. Eriksson S.:
Acta med. scand. 177, Suppl. 175 (1965)

15. Fermi C., Pernossi L.:
Zschr. Hyg. 18, 83 (1894)
16. Feuth H., Kemkes B., Hochstraßer K.:
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Forum, 133 (1975)
17. Figarella C., Negri G.A., Guy O.:
Proc. Int. Res. Conf. 2nd, Bayer Symp. V, 213 (1974)
18. Finkenstein W.R., Laskowsky M. Jr.:
J. Biol. Chem. 240, 962 (1965)
19. Finkenstein W.R., Laskowsky M. Jr.:
J. Biol. Chem. 242, 771 (1967)
20. Fritz H., Hartwich G., Werle E.:
Z. phys. Chemie 345, 150 (1966)
21. Fritz H., Brey B., Müller M., Gebhardt M.:
Proc. Int. Res. Conf. 1st, 28 (1970)
22. Fritz H., Heimbürger N., Meier M., Arnold M., Zanefeld
L.J.D., Schumacher G.F.B.:
Z. phys. Chemie 353, 1953-1956 (1972)
23. Ganrot P.O.:
Acta Universitatis Lundensis 2, 1-34 (1967)
24. Ganrot P.O., Bjerre B.:
Acta obst. et gynec. scand. 46, 1 (1967)
25. Ganrot P.O.:
Clin. Chim. Acta 15, 113 (1967)
26. Gordon A.H.:
In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular
Biology, Vol. 1 (1969)
27. Gorini L., Audrain L.:
Biochim. Biophys. Acta 8, 702 (1952)
28. Gorini L., Audrain L.:
Biochim. Biophys. Acta 10, 570 (1953)
29. Haupt H., Heimbürger N., Krantz, Schwick G.:
Eur. J. Biochem. 17, 254 (1970)

30. Hedfors E., Kistner S., Norberg R.:
Acta med. Scand. 190, 347-351 (1971)
31. Heide K., Heimbürger N., Haupt H.:
Clin. Chim. Acta 11, 82 (1965)
32. Heimbürger N., Schwick G.:
In: Protides of the biological fluids, Elsevier Publ.
Comp. Amsterdam, 303 (1961)
33. Heimbürger N., Schwick G.:
Thromb. Diathes. haemorrh. 7, 432-444 (1962)
34. Heimbürger N., Haupt H., Schwick H.G.:
In: Proc. of the Int. Res. Conf. on Proteinase Inhib.,
Fritz H., Tschesche H., eds., 1-21 (1971)
35. Heimbürger N.:
Proc. Int. Res. Conf. 2nd, Bayer Symp. V, 14-22 (1974)
36. Hochstraßer K., Reichert R., Schwarz S., Werle E.:
Z. phys. Chemie 353, 221-226 (1972)
37. Hochstraßer K., Schuster R., Reichert R., Heimbürger N.:
Z. phys. Chemie 353, 1120-1124 (1972)
38. Hochstraßer K., Reichert R., Heimbürger N.:
Z. phys. Chemie 354, 587-588 (1973)
39. Hochstraßer K., Reichert R., Schwarz S., Werle E.:
Z. phys. Chemie 354, 923-926 (1973)
40. Hochstraßer K., Feuth H., Steiner O.:
Z. phys. Chemie 354, 927-932 (1973)
41. Hochstraßer K., Feuth H., Hochgesand K.:
Bayer Symp. V, 111 (1974)
42. Hochstraßer K., Feuth H., Fall J., Kemkes B.:
Klin. Wschr. 52, 1015-1017 (1974)
43. Hochstraßer K., Feuth H., Kemkes B., Fall J., Werle E.:
Klin. Wschr. 52, 1018-1020 (1974)
44. Hochstraßer K., Bretzel G., Feuth H., Hilla W., Lempart K.:
Z. phys. Chemie 357, 153-162 (1976)

45. Hochstraßer K., Niebel J., Feuth H., Lempart K.:
Klin. Wschr. 55, 337 (1977)
46. Hochstraßer K., Niebel J., Lempart K.:
Klin. Wschr. 55, 343 (1977)
47. Horner C.H.W., Briggs J.D., Howie P.W., Kennedy A.C.:
J. clin. Path. 25, 590-593 (1972)
48. Jakobsson K.:
Scand. J. clin. Lab. Invest. 7 (1955), 57 Suppl. 14
49. Karlson P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Georg Thieme Verlag,
Stuttgart (1974)
50. Kazal L.A., Spicer D.S., Brahinsky R.A.:
J. Am. Chem. Soc. 70, 3034 (1948)
51. Keil B.:
In: Structure-Funktion Relationships of Proteolytic
Enzymes, Desnuelle P., Neurath H., Ottesen M., eds.,
102-112 (1970)
52. Kemp J.H., Johnstone J.M.:
Brit. J. Cancer 18, 390 (1964)
53. Kueppers F., Bearn A.G.:
Proc. Soc. exp. Biol. 121, 1207 (1966)
54. Kunitz M., Northrop J.H.:
J. Gen. Physiol. 19, 991 (1936)
55. Landerman N.S., Webster M.E., Becker E.L., Ratcliffe H.E.:
J. Allergy 33, 330 (1960)
56. Landsteiner K.:
Zbl. Bakt. 27, 357 (1900)
57. Laskowsky M., Wu F.C.:
J. Biol. Chem. 204, 797 (1953)
58. Laurell C.B., Eriksson S.:
Scand. J. clin. Lab. Invest. 15, 132 (1963)

59. Laurell C.B.:
Anal. Biochem. 10, 358 (1965)
60. Laurell C.B.:
Anal. Biochem. 15, 45 (1966)
61. Mahler H.R., Cordes E.H.:
Biological Chemistry (1968)
62. Mallory P.A., Travis J.:
Biochemistry 12, 2847 (1973)
63. Nitschmann J., Kistler P., Lergier W.:
Helv. Chim. Acta 37, 886 (1954)
64. Odegard O.E., Abildgaard U., Fagerhol M.K.:
IVth Int. Congr. on Thrombosis and Haemostasis 225 (1973)
65. Orochs G.J., Nordschow C.D.:
Intersoc. 1972, 271
66. Peanasky R.J., Laskowsky M.:
J. Biol. Chem. 204, 153 (1953)
67. Peterson E.A., Sober H.A.:
J. Am. Chem. Soc. 78, 751 (1956)
68. Proksch G.J., Lane J., Nordschow C.D.:
Clin. Biochem. 6, 200-206 (1973)
69. Pugliese and Coggi:
Bulletino Scienze med. (1897)
70. Refvem O., Fagerhol M.K., Abildgaard U.:
Acta med. scand. 193, 307-309 (1973)
71. Reichert R., Hochstraßer K., Werle E.:
Z. Laryng. Rhinol. 51, 190-193 (1977)
72. Rosen F.S., Characke P., Pensky J., Donaldson V.H.:
Science 148, 957 (1965)
73. Rybak M., Brada Z., Hais J.M.:
Säulenchromatographie an Zellulose-Ionenaustauscher,
Verlag Gustav Fischer, Jena 1966

74. Schön H., Rässler B., Alter J.:
Clin. Chim. Acta 7, 571 (1962)
75. Schultze H.E., Göllner I., Heide K., Schönenberger M.,
Schwick G.:
Z. Naturforschung 10b, 463 (1955)
76. Schultze H.E., Heide K., Haupt H.:
Klin. Wschr. 40, 427 (1962)
77. Schumacher G.F.B., Zaneveld L.J.D.:
Proc. Int. Res. Conf. 2nd, Bayer Symp. V, 178 (1974)
78. Shulman N.R.:
J. Exp. Med. 95, 593 (1952)
79. Shulman N.R.:
J. Biol. Chem. 213, 655-671 (1955)
80. Steinbuch M.: Nature 192, 1196 (1961)
81. Steinbuch M., Audran R.:
C. R. Acad. Sci. 260, 7058 (1965)
82. Steinbuch M., Audran R.:
In: Protides of Biological Fluids 14, 185-188 (1966)
83. Steinbuch M., Audran R., Lambin P., Fine J.M.:
23rd Colloq. on Protides of the Biological Fluids,
115-118 (1975)
84. Steinbuch M.:
Methods in Enzymology Vol. 45, 760-772 (1976)
85. Steines W.J., Mehl J.W.:
J. Lab. clin. Med. 67, 559-565 (1966)
86. Van der Meer J., Stoepman-Van Daleh E.A., Jansen J.M.S.:
IVth Int. Congr. on Thrombosis and Haemostasis 226 (1973)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. H. Naumann für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz sowie Herrn Prof. Dr. K. Hochstraßer für die großzügige Überlassung des Themas.

Dank schulde ich auch Herrn Dr. G. Bretzel für seine bereitwillige wissenschaftliche Anleitung und Frä. Rossmann für ihre Mithilfe bei der labortechnischen Durchführung der Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 12. Februar 1954 wurde ich, Dorothea Fischbacher, als erstes Kind des Volksschulrektors Lorenz Fischbacher und seiner Ehefrau Josefa, geb. Landersdorfer, in Rosenheim geboren.

Dort besuchte ich von 1960 bis 1964 die Volksschule, darnach von 1964 bis 1973 das Ignaz-Günther-Gymnasium.

Nach bestandener Reifeprüfung nahm ich im Wintersemester 1973/74 an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Humanmedizin auf. Im Sommer 1975 legte ich die Ärztliche Vorprüfung, ein Jahr später den Ersten Abschnitt und im August 1978 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

